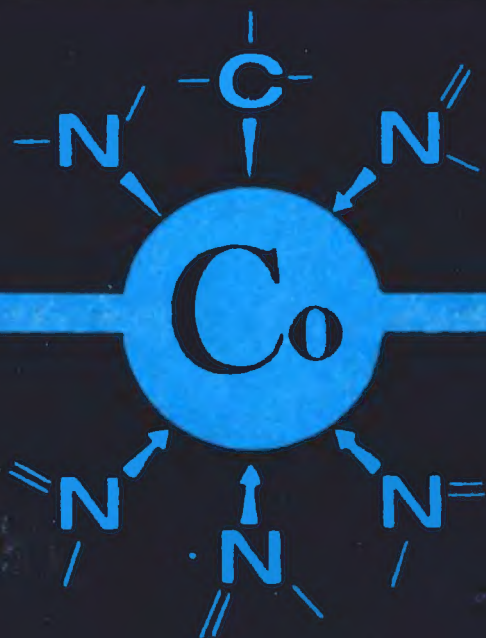


VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

КОФЕРМЕНТЫ



КОФЕРМЕНТЫ

Под редакцией
проф. В. А. Яковлева



Москва «Медицина»
1973

В книге изложено современное состояние знаний в области коферментов — важных природных соединений, принимающих участие практически во всех процессах жизнедеятельности живых организмов. В настоящее время все более расширяются исследования по применению коферментов (например, кокарбоксилазы, пиридоксаль-5-фосфата, кобамидного кофермента и др.) как лекарственных препаратов в медицинской практике.

В книге описаны химические и биохимические аспекты изучения коферментов, являющиеся основой для понимания механизма действия ферментов и дающие возможность направленного подбора их ингибиторов.

Монография представляет интерес для широкого круга специалистов, работающих в различных областях медицины, биологии, биохимии и органической химии.

ВВЕДЕНИЕ

В. А. ЯКОВЛЕВ

*Всесоюзный научно-исследовательский витаминный
институт, Москва*

История изучения коферментов развивается удивительно неровно. Она переживала и стремительные взлеты, вызывая энтузиазм исследователей, когда казалось, что именно на этом пути механизм ферментативного катализа будет расшифрован. Были и периоды пессимизма, когда оказывалось, что, несмотря на исчерпывающую ясность строения и химизма превращений коферментов в ходе каталитического акта, истинный молекулярный механизм действия ферментов по-прежнему остается «синей птицей». В наше время эта область исследований развивается относительно спокойно и вклад химии и биохимии коферментов в общую проблему ферментативного катализа становится все более ясно очерченным.

Цель этой книги — подвести некоторый итог исследований химических свойств и механизма действия основных известных ныне коферментов и попытаться сформулировать элементы стратегии и тактики дальнейших исследований в этой важной области энзимологии.

Историю коферментов можно начинать чуть ли не с начала нашего века. Действительно, в 1905 г. Harden и Yong обнаружили термостабильный небелковый фактор, необходимый для брожения, получивший далее название козимазы. Это, разумеется, был важный факт, заставлявший думать о роли низкомолекулярных веществ небелковой природы в сложных ферментативных процессах. Однако это открытие не внесло в тот период ничего существенного в теорию ферментативного катализа. Во-первых, не было ясно, к какой стадии процесса брожения относится козимаза. Во-вторых, тогдашний методический уровень не позволял получить

козимазу в индивидуальном состоянии и изучить ее строение, а без этого ценность обнаруженного факта была ограниченной.

Истинная история коферментов начинается спустя примерно 30 лет после открытия Harden и Yong и связана в первую очередь с работами лабораторий Warburg и Euler.

В 1931 г. в лаборатории Warburg при изучении окислительного распада углеводов был обнаружен кофермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Этот кофермент в 1933—1935 гг. был выделен в индивидуальном состоянии и было установлено наличие в его составе амида никотиновой кислоты, аденина, рибозы и фосфорной кислоты. Так был открыт трифосфопиридиннуклеотид (ТПН, кодегидрогеназа I), а позднее дифосфопиридиннуклеотид (ДПН, кодегидрогеназа II). Тогда же в лаборатории Warburg было выяснено, что механизм действия ТПН и ДПН состоит в обратимом окислении — восстановлении пиридинового ядра. В 1936 г. Kagger пришел к заключению, что присоединение водорода в процессе восстановления ТПН происходит по второму углеродному атому пиридинового ядра. Как известно, эта ошибочная точка зрения держалась довольно долго, до 1955 г., когда Loewus, Vennesland и Harris в опытах с дейтерием показали, что в действительности восстановление является стереоспецифичным и идет в положении 4.

К 30-м годам относятся работы по установлению природы кофермента «желтого дыхательного фермента», открытого и изолированного в очищенном виде также в лаборатории Warburg.

Первоначально был изолирован люмифлавин, далее Кип показал, что на самом деле в кофермент входит рибофлавин и, наконец, в 1934 г. Theorell показал, что истинным носителем коферментной функции является рибофлавинмонофосфат.

Было установлено, что функционирование этого кофермента состоит в обратимом окислении — восстановлении изоаллоксазиновой группировки.

Конец 20-х и 30-е годы нашего столетия ознаменовались открытием значительного числа коферментов, активных групп или простетических групп (терминология в те годы не уточнялась): железо в составе цитохромов, каталазы и пероксидазы, медь — в полифенолоксидазе, адениннуклеотиды в составе переносящих фосфат ферментов, тиаминпирофосфат — кофермент карбоксилазы.

Это был период бурного развития коферментного направления, когда казалось, что наконец-то тайна ферментативного катализа открыта. Появившаяся в журнале «Успехи химии» в 1938 г. и посвященная химии коферментов статья Warburg имела название «Химическое строение ферментов» и вполне соответствовала духу того времени, вере в то, что химия коферментов — это и есть химия ферментов. Warburg в этой статье писал: *...активные группировки соединенных с белками простетических групп путем простых промежуточных химических реакций производят каталитический эффект, называемый ферментным действием.* Белковой части фермента школа Варбурга в то время отводила роль компонент, определяющих лишь специфичность в отношении субстрата.

Последующий период энзимологических исследований ознаменовался открытием многих других коферментов или простетических групп и выяснением химизма их участия в ферментативных реакциях. Здесь в первую очередь следует назвать открытие пиридоксальфосфата и классические работы А. Е. Браунштейна и его сотрудников, а также Spell в области химизма действия этого кофермента. Далее — открытие кофермента ацетилирования — коэнзима А, которое, по моему мнению, должно быть приписано независимым работам Nachmannsohn и Lippman, хотя, конечно, решающая роль в установлении строения и механизма действия принадлежит Lippman; открытие липоевой кислоты и установление участия ее наряду с тиаминдифосфатом в специфических реакциях окисления кетокислот; установление коферментной функции биотина в реакциях вовлечения CO_2 в метаболические процессы; открытие кобамидного кофермента; установление роли тетрагидрофолиевой кислоты в реакциях переноса; открытие убихинонов и изучение их роли в качестве кофакторов окислительных процессов. Здесь перечислены далеко не все открытия в области коферментов.

Важно, однако, подчеркнуть одно обстоятельство. Изучение многих новых коферментов и выяснение того, как они работают в ферментативных реакциях, не оправдало оптимистической оценки Warburg. Мы часто знаем химизм превращений коферментов в ходе энзиматической реакции. Однако при этом остается не вполне ясным, почему именно эти превращения проходят и как достигается каталитическая скорость реакции, не говоря уже о субстратной специфичности,

Я думаю, что это вплотную подводит нас к самому актуальному вопросу сегодняшнего дня — проблеме взаимоотношений коферментов и белков, ибо нет сомнений в том, что высокий каталитический эффект, как и специфичность, заложены в структуре белка — апофермента в неменьшей мере, чем в структуре кофермента.

Вторая проблема, которой я хотел бы кратко коснуться, — это проблема прикладного значения изучения коферментов.

Уже давно замечено, что большинство коферментов находится в тесной связи с витаминами. Мы знаем, какова профилактическая роль витаминов в охране здоровья. Отмечен и лечебный эффект при применении массивных доз витаминов при некоторых заболеваниях.

Нет сомнения в том, что по крайней мере для значительной группы витаминов (так называемой группы В) биологический эффект определяется их превращениями в коферменты и ферменты в клетках организма. Отсюда естественными явились в недавнее время попытки прямого использования коферментов с лечебными целями.

Острое локальное снижение уровней коферментов является не редким патологическим признаком заболевания, и в этом случае применение готовых коферментов может быть одним из эффективных путей терапии. Имеются попытки и не безуспешные применения с практическими лечебными целями коферментов, таких, как кокарбоксилаза, липоевая кислота, флавиномононуклеотид, кобамидный кофермент, флавинадениндинуклеотид. Это направление использования коферментов вызывает необходимость разработки практически удобных методов их синтеза, исследования фармакологии коферментов, в том числе проблем проникновения их в ткани организма, а также многих других вопросов. А это в свою очередь требует широкого изучения химии и механизма действия коферментов, некоторые результаты которого составляют содержание этой книги.

КОФЕРМЕНТЫ И ИХ РОЛЬ В КАТАЛИТИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ФЕРМЕНТОВ

М. Я. КАРПЕЙСКИЙ, А. Е. БРАУНШТЕЙН

Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва

Ферментативные реакции, в отличие от химических превращений в растворе или на поверхности жестких катализаторов, протекают в полифункциональной и обладающей относительной подвижностью кооперативной системе. В эту систему входят высокополимерная молекула белка, субстрат и во многих случаях низкомолекулярный кофактор, и имеются потенциальные возможности для обеспечения различных и даже взаимоисключающих условий, требуемых для достижения максимальной скорости на каждой из стадий ферментативной реакции.

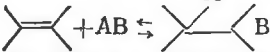
Феноменологически ферментативный катализ имеет две главные особенности: специфичность и высокую скорость реакции. Под специфичностью следует понимать в первую очередь высокое сродство фермента к какому-либо одному субстрату или типу субстратов (субстратная специфичность). Более того, во всех случаях ферментативная реакция протекает строго стереоспецифически, т. е. из всех возможных оптических и геометрических изомеров продукта образуется только какой-либо один определенный изомер.

Специфичность ферментативных реакций состоит еще и в том, что из нескольких возможных для данного субстрата превращений реализуется лишь одно.

Что касается скоростей ферментативных реакций, то они превышают на 5—10 порядков скорости аналогичных некаталитических реакций.

Согласно принятой в настоящее время классификации, все ферменты разделяют на 6 основных классов по типу катализируемой реакции [1]:

По абсолютной величине скорости катализируемой реакции только ферменты 3-й группы относятся к числу «медленных» (молекулярная активность $10\text{--}100\text{ сек}^{-1}$). Наи-

Класс ферментов	Тип реакции
1. Оксидоредуктазы	Перенос электронов или атомов водорода
2. Трансферазы	$AB + X \rightleftharpoons AX + B$
3. Гидролазы	$AB + H_2O \rightleftharpoons AH + BOH$
4. Лиазы	
5. Изомеразы	Рацемизация, эпимеризация, <i>цис-транс</i> -изомеризация, внутримолекулярный перенос групп
6. Лигазы (синтазы)	$A + B + ATP \rightleftharpoons AB + ADP + P$

большая скорость достигается в случае ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции (молекулярная активность порядка 10^8 сек.^{-1}). У «медленных» ферментов, служащих катализаторами наиболее простого типа химической реакции — реакции гидролиза, активный центр формируется за счет боковых цепей аминокислот, составляющих полипептидную цепь, и в некоторых случаях — ионов металлов. В остальных ферментах, которые ускоряют более сложные химические реакции со стереохимически однозначной конфигурацией продуктов, в состав активного центра обычно входит низкомолекулярное органическое соединение, как правило, содержащее систему π -связей и гетероатомы. Такие вещества носят название коферментов.

Условно можно разграничить две функции коферментов:

1. Непосредственное участие в каталитическом превращении субстрата одним ферментным белком. При этом кофермент может функционировать либо как катализатор, который регенерируется после каждого акта превращения субстрата (пиридоксаль-5-фосфат, тиаминдифосфат, ФАД, ФМН, биотин и др.), либо как косубстрат (НАД, НАДФ и др.). В последнем случае регенерация исходной формы кофермента осуществляется другим ферментом в сопряженной реакции.
2. Активация и перенос молекулы субстрата (или ее части) от одного фермента к другому. В этом варианте первоначально субстрат реагирует с коферментом в активном центре фермента таким образом, что образуется новое реакционноспособное производное субстрата, которое, однако, достаточно устойчиво в водной среде (ацилкофермент А, нуклеозиддифосфосаха-

ра, производные тетрагидрофолиевой кислоты, содержащие одноуглеродный остаток). Затем образовавшееся производное субстрата связывается с другим ферментом, в активном центре которого собственно и осуществляется каталитическое превращение субстрата с одновременной (или последующей) регенерацией кофермента.

Название, функция и классификация коферментов по сей день являются предметом разногласий. На наш взгляд, наиболее разумно классифицировать коферменты по химическому признаку, т. е. по тому классу органических соединений, производными которого они являются. По этому признаку коферменты можно разбить на три больших класса.

1. Коферменты (и аналогичные им кофакторы) алифатического ряда: гексозо-1,6-бисфосфаты, глутатион, липоевая кислота.

2. Коферменты ароматического ряда — убихиноны.

3. Коферменты гетероциклического ряда: пиридоксальфосфат, тетрагидрофолиевая кислота, нуклеозидфосфаты и их производные (КоА, НАД, ФМН, ФАД и т. п.), металлопорфириновые гемы, кобамидные коферменты.

Наряду с этим коферменты могут разделяться по функциональному признаку, например, следующим образом:

1. Коферменты оксидоредуктаз: НАД, НАДФ, флавиновые коферменты: липоевая кислота, металлопорфирины;

2. Коферменты трансфераз: нуклеозидфосфаты, фосфаты сахаров, КоА, фолиевая кислота, пиридоксальфосфат;

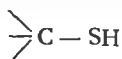
3. Коферменты лиаз, изомераз и лигаз: тиаминдифосфат, биотин, глутатион, пиридоксальфосфат, кобамидные коферменты.

Анализ структуры коферментов и данных относительно их взаимодействия со специфическими белками позволяют условно выделить в коферментах два функциональных участка — группировку, ответственную за связывание с белком, и собственно каталитическую часть.

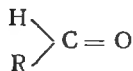
В ряде случаев ковалентная связь между коферментом и белком осуществляется через ϵ -аминогруппу апофермента и карбоксильную (амидная связь у ферментов, содержащих биотин или липоевую кислоту) или карбонильную группу (альдиминная связь у пиридоксальфосфат- и ретинальсодержащих белков) кофермента. Фосфатная группа в молекуле кофермента является еще одной точкой связи

с белком (пиридоксальфосфат, тиаминпирофосфат и др.) [2, 3].

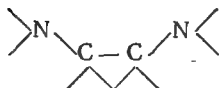
В качестве каталитического центра кофермента выступают участки, содержащие гетероатомы:



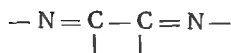
для коэнзима А, глутатиона, липоевой кислоты,



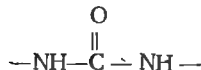
для пиридоксальфосфата,



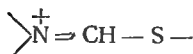
для тетрагидрофолиевой кислоты,



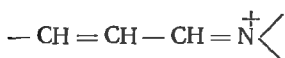
для флавинов,



для биотина,



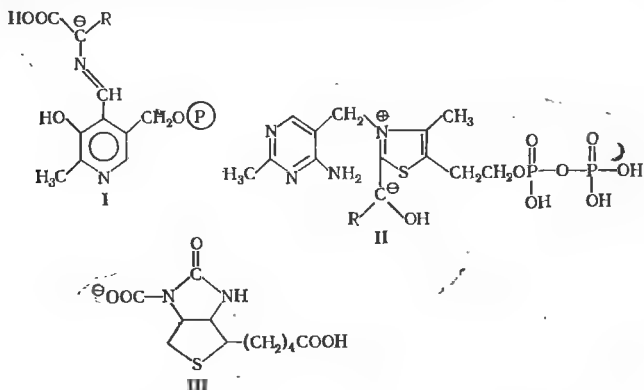
для тиаминпирофосфата,



для НАД и НАДФ.

В случаях, когда при изучении механизма действия ферментов, нуждающихся в коферменте, удавалось аналитически обнаружить или выделить препаративно промежуточные фермент-субстратные (или квазисубстратные) комплексы, оказывалось, что они обязательно содержат кофермент (флавиновые, пиридоксальные, биотиновые, тиаминные ферменты) [3, 4]. Отсюда можно заключить, что кофермент располагается в активном центре и вместе с субстратом и функциональными группами активного центра апофермента образует активированный комплекс. Участие в таком комплексе неподеленных пар электронов гетероатомов и делокализованных электронов кофермента (в том числе принадлежащих комплексно связанным металлам) существенно облегчает разрыв (или синтез) ковалентных связей в реагирующей группировке молекулы субстрата. В качестве примера можно привести образование карбаниона в реакциях, катализируемых ферментами, содержащими тиаминдифосфат (II) или пиридоксальфосфат (I). Сильная поляризация связи C—N (связь между

карбоксильной группой и уреидным атомом азота) в карбоксибиотине (III) определяет химический смысл термина «активная углекислота» и позволяет понять механизм ферментативных реакций карбоксилирования и транскарбоксилирования, протекающих с участием биотина.



Наличие гетероатомов в молекуле кофермента создает благоприятные условия для регулирования распределения электронной плотности в фермент-субстратных комплексах путем протонирования и депротонирования. Кофермент способствует в ходе ферментативной реакции созданию необходимой электронной плотности на том или другом атоме реагирующей системы [5].

Вместе с тем следует отметить, что коферменты благодаря наличию в них гетероатомов и систем π -связей являются великолепными метчиками активного центра фермента. Как указывалось выше, для коферментсодержащих белков катализируемая реакция протекает путем образования комплексов с коферментом. Следовательно, изучая подходящим методом изменения в физических параметрах присоединенного к белку кофермента, происходящие под влиянием субстрата, можно получить ценную информацию о механизме самого процесса. Этот подход успешно используется при анализе механизма действия пиридоксальфосфатсодержащих ферментов (трансаминазы, декарбоксилазы глутаминовой кислоты, фосфорилазы и др.), НАД- и ФАД-зависимых ферментов (лактатдегидрогеназы, оксидазы D-аминокислот и др.).

Еще одной интересной особенностью коферментсодержащих ферментов является то, что в комплексе апофермент —

кофермент оба компонента существенно влияют на свойства друг друга. Так, апофермент в ряде случаев обладает по сравнению с холоферментом меньшей конформационной устойчивостью и более рыхлой структурой. В свою очередь кофермент при связывании с апоферментом приобретает индуцированную оптическую активность. Таким образом, возникает уникальный способ детектировать изменения микроокружения кофермента в ходе ферментативной реакции. Этот прием весьма успешно используется при работе с пиридоксальфосфат- и НАД-содержащими ферментами [4, 6].

Следовательно, коферменты (и синтетические структурные аналоги коферментов) являются прекрасным инструментом для изучения структуры и функции активного центра фермента.

Практическая значимость работ с аналогами коферментов связана с возможностью создания эффективных лекарственных средств путем целенаправленной модификации отдельных частей молекулы кофермента. Правильный выбор направлений поиска таких средств зависит от уровня знаний связи между структурой и функцией кофермента [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Номенклатура ферментов. М., 1966.
2. Schmidt U., Grafen P., Atlandt K., Goedde H. *Advances in Enzymology*, 1969, 32, 423.
3. Krampitz L. В кн.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1969, 38, 213.
4. Химия и биология пиридоксалевого катализа. М., 1968.
5. Пюльман Б., Пюльман А. *Квантовая биохимия*. М., 1965.
6. Beuchok S. *Ann. Rev. Biochem.*, 1968, 37, 437.
7. Baker B. *Design of Active-Site Directed Irreversible Enzyme Inhibitors*. John Wiley. New York, 1967.

Г Л А В А II

КОФЕРМЕНТЫ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА С АПОФЕРМЕНТАМИ ДЕГИДРОГЕНАЗ

Н. И. МАЛЫЦЕВ

*Всесоюзный научно-исследовательский витаминный
институт, Москва*

Введение

Большое число дегидрогеназ, катализирующих важные процессы метаболизма в живом организме, содержат в качестве кофермента никотинамидадениндинуклеотид (НАД). Несмотря на значительную информацию, доступную в настоящее время, в механизме их действия остается много неясного.

Поведение кофермента в активном центре дегидрогеназ продолжает оставаться одним из наиболее интересных вопросов как с точки зрения взаимного влияния отдельных элементов структуры НАД на реакционную способность никотинамидной компоненты, так и с точки зрения понимания механизма последующего связывания субстрата и влияния на саму белковую молекулу, в частности на ее вторичную, третичную и четвертичную структуры.

Для большинства дегидрогеназ точно не охарактеризованы функциональные группы, участвующие в связывании низкомолекулярных участников реакции и непосредственно в катализе. Имеющиеся в литературе данные о природе таких групп, полученные кинетическими и физико-химическими методами, как правило, нуждаются в дальнейшем подтверждении и уточнении прямыми химическими методами.

Принципиально важной проблемой является последовательность стадий ферментативного процесса и те конформационные превращения, которые претерпевают все участники реакции — фермент, кофермент, субстрат — и которые позволяют, во-первых, снизить энергию активации ферментативной реакции, а во-вторых, ориентировать взаимодействующие молекулы по координате реакции. По мнению

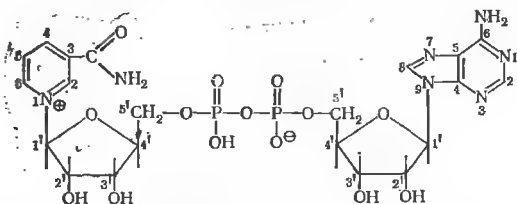
А. Е. Браунштейна, наличие «определенных изменений кооперативных геометрических и электронных переходов в процессе каталитического акта» позволяет рассматривать «несравненную эффективность ферментативного катализа как обусловленную уникальной согласованностью взаимодействий в четырехмерном реакционном центре», подразумеваемая под «четвертым измерением» время [1].

Вопрос о связывании и функционировании НАД в активном центре является общим для ряда дегидрогеназ независимо от их субстратной специфичности. Стадия взаимодействия с коферментом является определяющей в том смысле, что предшествует связыванию субстрата, и может быть поэтому исследована независимо в двухкомпонентной системе фермент — кофермент. Рассмотрению данных такого рода в этом обзоре предшествует описание структуры и свойств молекулы НАД, а также характеристика функциональных групп белка — второго участника реакции образования фермент-коферментного комплекса¹.

Структура и свойства НАД

В литературе периодически публикуются обзоры, посвященные НАД и НАД-зависимым ферментам. Обширные экспериментальные данные, полученные Kaplan и др., были суммированы в ряде работ [2, 3].

Молекула НАД состоит из двух гетероциклов — пиридинового и аденинового, соединенных цепочкой из двух остатков рибозы и остатка пиррофосфорной кислоты.



Рабочей частью молекулы является никотинамидное кольцо, участвующее в окислительно-восстановительных реакциях и в реакциях присоединения нуклеофильных агентов. Восстановление его с помощью дитионита натрия, а также субстратами в реакциях, катализируемых фермен-

¹ Под понятием фермент-коферментный комплекс здесь и далее подразумевается, строго говоря, продукт взаимодействия апофермента с коферментом. — *Прим. ред.*

тами, приводит к образованию НАДН — 1,4-дигидроникотинамидадениндинуклеотида.

В растворе НАД проявляет слабокислые свойства. Было выполнено потенциметрическое титрование НАД гидроокисью натрия при различной ионной силе раствора [4]. Экстраполяцией к нулевой ионной силе термодинамическая величина pK_a была найдена равной $3,88 \pm 0,02$. В молекуле НАД заряд пиридиниевого катиона компенсируется отрицательным зарядом одной из фосфатных групп. Природа группы, ионизация которой обнаруживается в растворе, точно не установлена. Согласно исследованиям спектров ПМР, скорее всего это может быть ароматический атом N_1 аденинового кольца [48, 56].

Одним из важных направлений в изучении механизма действия ферментов является расшифровка механизма конгруэнтной модельной реакции. Для НАД-зависимых дегидрогеназ неизвестны в настоящее время такие реакции. Описаны, однако, реакции, в которых НАД и НАДН выступают в роли окислителя или восстановителя [5—8].

НАД является полифункциональной молекулой, содержащей катионные и анионные группы. Остатки рибозы и пирофосфатная группа сообщают ей ярко выраженный полярный характер, в то время как пиридиновый и пуриновый циклы гидрофобны. Вследствие такого многообразия свойств молекула НАД взаимодействует не только с большим числом апоферментов, но и с различными низкомолекулярными соединениями.

Восстановленная форма НАД, как и многие дигидропиридины, является энергичным восстановителем. Для восстановления никотинамидного кольца в модельных системах отсутствует необходимость во всей остальной части молекулы НАД. Так, описан нестереоспецифический обмен водорода в системе $1\text{-пропилникотинамид} \rightleftharpoons 1\text{-пропил-1,4-дигидроникотинамид}$ [9] и восстановление гексахлорацетона под действием 1-бензил-1,4-дигидроникотинамида [10].

Скорость, с которой тот или иной 1,4-дигидропиридин окисляется 2,6-дихлорфенолиндофенолом, обратно пропорциональна «средству» соответствующего пиридина к CN^- . Wallenfels сделал из этого вывод, что водород переносится в реакции окисления — восстановления в виде гидрид-иона H^- .

Был проведен расчет электронной плотности в молекуле никотинамидных соединений и построена молекулярная

диаграмма (рис. 1) [12]. Из диаграммы следует, что наибольший положительный заряд имеет атом углерода в положении 4, вследствие чего именно он атакуется гидрид-ионом.

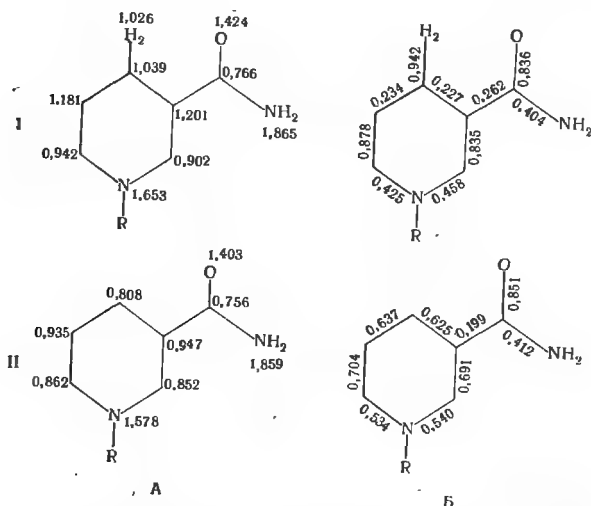


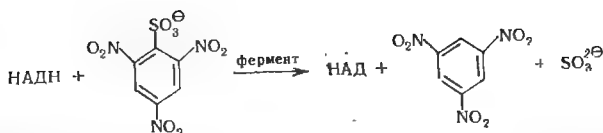
Рис. 1. Молекулярные диаграммы НАДН и НАД [12].
I—НАДН (энергия резонанса 1,709 ккал/мол); II—НАД (энергия резонанса 2,477 ккал/мол).

A — величина электрического заряда; Б — порядок связей.

Двухлористая ртуть образует с 3-ацетилпиридинаденин-динуклеотидом комплекс, обнаруживаемый по появлению ультрафиолетового спектра, отличного от спектра исходного динуклеотида [3]. Недавно были опубликованы данные, описывающие взаимодействие НАДН и Fe^{3+} , при котором образуется голубой комплекс и происходит окисление НАДН—восстановление Fe^{3+} [13]. В образовании комплекса принимают, по-видимому, участие атомы азота гетероциклов.

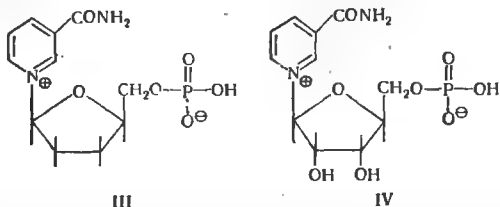
НАДН легко окисляется кислородом воздуха, находясь в связанном состоянии на ферментах [14, 15]. При этом образуется перекись водорода. В присутствии 4-амино-2,6-дигидрофенола НАДН стехиометрически окисляется молекулярным кислородом [16].

По данным Bates с сотрудниками, глутаматдегидрогеназа катализирует с участием НАДН образование тринитробензола из тринитробензолсульфокислоты [17].



Реакция стереоспецифична и является совершенно необычной для НАДН.

Адениновое кольцо, остатки рибозы и пирофосфат влияют на реакционную способность никотинамидного кольца в НАД. Так, эфирная группа в этилникотинатадениндинуклеотиде гидролизруется существенно медленнее, чем в этиловом эфире 1-метилникотиновой кислоты [18]. При действии перманганата калия в нейтральном растворе никотинамидное кольцо в 2,3-дидезоксиникотинамидмононуклеотиде (III) окисляется значительно труднее, чем в природном никотинамидмононуклеотиде (IV) [19].



Способность никотинамидного кольца НАД присоединять по 4-углеродному атому различные нуклеофильные агенты, такие, как пируват, диоксиацетон, меркаптаны, гидроксил-амин, ионы CN^- , SO_3^{2-} и $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$, является чрезвычайно важной.

Величина константы диссоциации аддукта R-PyX позволяет оценить электрофильность молекулы и предсказать поведение ее в различных системах.

Карлап с сотрудниками был предложен спектрофотометрический метод определения НАД, основанный на образовании аддукта НАД-CN^- , имеющего спектр с характеристической полосой поглощения при 325 нм [20]. Было показано, что никотинамид, N-метилникотиновая кислота и НАД-N_2 не реагируют с CN^- , что указывало на важную роль одновременно карбоксамидной группы и положительно заряженного атома азота пиридиниевого кольца в способности С-4 атома присоединять нуклеофильный агент. Аддукты N-метилникотинамид- CN^- и НАД-CN^- имели практически идентичный спектр [20, 21].

Продукт присоединения сульфита к НАД был обнаружен спектрофотометрически еще в 1938 г. [22]. Он обладает сильным поглощением при 329 нм и обнаруживается даже в разбавленных растворах: $2 \cdot 10^{-4}$ М сульфита и $5 \cdot 10^{-5}$ М НАД. При более сильном разведении комплекс почти полностью диссоциирует на компоненты. Коэффициент молярной экстинкции $\epsilon_{\text{М } 320 \text{ нм}} = 71\,000$ [23]. Аддукт сульфит-НАД аналогичен по структуре аддукту CN⁻-НАД, НАДН и является, вероятно, соединением, в котором сульфит присоединен в положение 4 никотинамидного кольца.

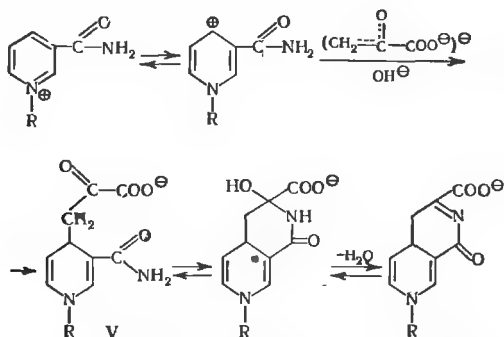
Аддукт сульфит-НАД связывается с аполактатдегидрогеназой сердца свиньи в 1000 раз прочнее, чем НАД. Такой комплекс устойчив против протеолитического действия субтилизина [24].

Электрофильные свойства положения 4 никотинамидного кольца можно оценить, сравнив способность ряда аналогов присоединять CN⁻-ион. Так, 5-аминопиридинадениндинуклеотид реагирует слабо с CN⁻-ионом вследствие электроположительного индуктивного эффекта аминогруппы [25]. Точно так же 3-метилпиридинадениндинуклеотид, 3-пиридилкарбиноладениндинуклеотид, 3-аминопиридинадениндинуклеотид не реагируют с CN⁻-ионом и не обладают коферментной активностью. Как правило, аналоги НАД, обладающие меньшим сродством к CN⁻-иону, имеют и более отрицательный окислительно-восстановительный потенциал [26]. Знание констант равновесия реакций присоединения CN⁻-иона позволило вычислить величины окислительно-восстановительных потенциалов ряда аналогов [27]. Оказалось, что точное соответствие между способностью присоединять CN⁻-ион и величиной окислительно-восстановительного потенциала, с одной стороны, и биологической активностью, с другой стороны, отсутствует. Окислительно-восстановительный потенциал 5-метилникотинамидадениндинуклеотида на 12 мВ более электроотрицателен, чем потенциал НАД, что позволяет предположить менее легкую способность восстанавливаться. Восстановленная форма этого аналога должна окисляться, наоборот, легче, чем НАДН. Опыты с дегидрогеназами, однако, показали, что 5-метилдигидроникотинамидадениндинуклеотид не окисляется в условиях окисления НАДН [25]. По-видимому, влияние метильной группы на распределение электронной плотности в кольце не является причиной отсутствия коферментной активности. То же самое относится к никотинилгидразидадениндинуклеотиду и пиридил-3-альдоксим-

адениндинуклеотиды — аналогам, которые имеют более чем на 20 мв отрицательный окислительно-восстановительный потенциал по сравнению с НАД, но их восстановленные формы реагируют в процессах, катализируемых алкогольдегидрогеназой печени лошади, почти в 2 раза медленнее, чем НАДН. Важным в ходе катализа является, вероятно, вполне определенное соответствие (комплементарность) молекулы кофермента участку связывания на поверхности фермента. Следует иметь в виду возможность жестких требований к конформации НАД на стадии связывания.

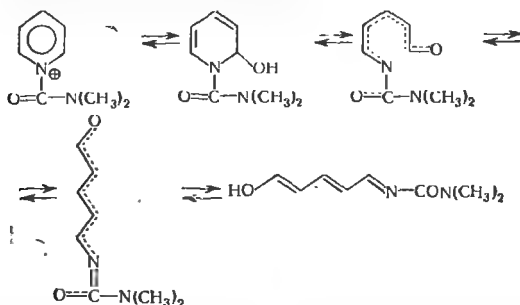
Аддукты по положению 4 никотинамидного кольца в ряде случаев (например, с пируватом и диоксиацетоном) моделируют промежуточный комплекс кофермент-субстрат; вследствие чего исследование условий их образования, стабильности и возможных превращений представляется весьма перспективным.

Продукт присоединения пировиноградной кислоты к НАД [V] обнаруживается в сильно щелочной среде по изменению спектров инфракрасного, ультрафиолетового и ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) и претерпевает ряд последовательных превращений [28].

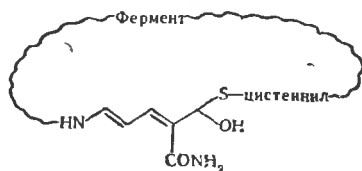


Интересно, что фермент (лактатдегидрогеназа) катализирует образование V уже при относительно невысоких значениях pH. Это объясняет ингибирование лактатдегидрогеназы высокими концентрациями НАД [30]. Поскольку пировиноградная кислота (как субстрат в реакции с НАДН) и НАД связываются с ферментом специфически, факт образования комплекса V свидетельствует о непосредственной близости субстрат- и коферментсвязывающих участков активного центра лактатдегидрогеназы, допускающих контакт НАД и пировиноградной кислоты.

Хорошо известна возможность размыкания цикла по связи 1—2 у пиридиновых производных. Присоединение OH^- -иона к 1-(N,N-диметилкарбамоил) пиридиний хлориду приводит, по данным Johnson, Rump [31], к образованию производного глутаконового альдегида в соответствии со следующей схемой реакций:



По предположению авторов, такое обратимое раскрытие пиридинового цикла НАД может происходить в ходе превращений на ферменте.

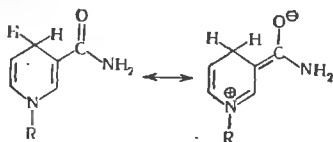


Связывание НАД в активном центре может происходить за счет тиополуацетальной связи с SH -группой фермента. Возможно, что субстрат, связываясь на последующей стадии ферментативного катализа, вызывает замыкание пиридинового цикла, приобретающего, таким образом, способность восстанавливаться. Это явление может лежать в основе субстратной специфичности.

НАДН и НАД существенно различаются по своим оптическим свойствам. В ультрафиолетовом спектре НАД имеется максимум при 260 нм благодаря поглощению в этой области как никотинамидного, так и аденинового колец. В спектре НАДН, кроме максимума при 260 нм, появляется полоса поглощения с максимумом в области 340 нм, что обусловлено дигидроникотинамидным кольцом.

Как положение максимума, так и интенсивность поглощения этой полосы может меняться в зависимости от по-

лярности среды, что определяется относительным структурным вкладом хиноидной формы НАДН, несущей положительный и отрицательный заряды, соответственно на атоме азота пиридинового кольца и атоме кислорода карбоксамидной группы.



Спектр возбуждения флюоресценции НАДН имеет два максимума: при 340 нм — за счет поглощения никотинамидного кольца и при 260 нм — в области, где 80—90% энергии поглощает пуриновая компонента [32], что объясняется внутримолекулярным переносом энергии с пуриновой на дигидроникотинамидную компоненту [33].

В вопросе о конформации НАД и НАДН следует выделить две стороны (в порядке важности и сложности): 1) конформация НАД в растворе и 2) конформация НАД в фермент-коферментном комплексе. Строгая ориентация в пространстве отдельных частей молекулы динуклеотида необходима для вполне определенного расположения никотинамидного кольца относительно функциональных групп фермента, а также молекулы субстрата. Малейшее изменение углов валентных связей или межатомных расстояний в молекуле кофермента должно приводить к нарушению уникальной согласованности и эффективности каталитического процесса. Вследствие комплементарности молекулы кофермента участку связывания поверхности фермента (кофермент является «слепком» с участка связывания) изучение структуры НАД в фермент-коферментном комплексе дает непосредственную информацию о пространственном расположении функциональных групп активного центра фермента, взаимодействующих с коферментом.

Предположение о том, что НАД и НАДН находятся в водном растворе не в планарной конформации, а в свернутой (гетероциклические основания сближены и взаимодействуют друг с другом), было подтверждено данными по изучению конформации различных динуклеотидов и модельных соединений разными физико-химическими методами. В ранних работах Weler [33], Shifrin и Kaplan [49] и Velick [168] было показано, что в органических растворителях и при повышении температуры раствора перенос энергии возбуж-

дения от аденинового кольца к никотинамидному уменьшается или совсем исчезает, что проявляется в уменьшении интенсивности коротковолновой полосы возбуждения флюоресценции. Tietgen и др. показали, что при увеличении концентрации метанола в спектре флюоресценции НАДН уменьшается интенсивность эмиссии при 247,5 нм, а при 334 нм — возрастает, причем мерой развернутости молекулы может служить отношение $I_{247,5}:I_{334}$ [34]. В растворах с высокой концентрацией спирта (70—80%) по сравнению с чистой водой это отношение уменьшается примерно в 4 раза.

Пытаясь понять механизм переноса энергии, Scott, Weber и др. [169] определили величины абсолютного квантового выхода и времени жизни возбужденного состояния НАДН и ряда модельных соединений в воде и 1,2-пропандиоле. Ими показано, что перенос энергии в этих системах может осуществляться только при близком расположении гетероциклических оснований, т. е. в так называемой сложной конформации (или конформациях), и эффект переноса энергии от аденозина к дигидроникотинамидному кольцу для НАДН в воде при 25° равен 34% и отсутствует в 1,2-пропандиоле. Исследование структурных аналогов НАДН показало, что перенос энергии в ацетилпиридиновом аналоге больше, а в гипоксантиновом — меньше, чем в НАДН [168]. Эффективность внутримолекулярного взаимодействия в этих соединениях подтверждается данными гипохромизма (уменьшение УФ поглощения в ди- и полинуклеотидах по сравнению с поглощением составляющих их моонуклеотидов) [170] и ЯМР.

К настоящему времени имеется серия экспериментальных работ, посвященных исследованию конформации динуклеотидов методом ПМР. Прежде всего следует отметить работы Sarna и Kaplan [35—37, 45, 47, 50]. В последнее время Jacobus [171] подверг критике некоторые аспекты их исследований; эта критика связана в основном с более тонкими деталями взаимодействия оснований во внутримолекулярном комплексе, сам же факт сближения оснований в конформационном равновесии, по-видимому, отрицать нельзя в согласии с данными других методов.

Сравнивая ПМР спектры водных растворов динуклеотидов со спектрами соответствующих моонуклеотидов, Jagdetzky и др. [56] отметили смещение сигналов протонов ароматических оснований в сильное поле и сделали вывод о параллельном расположении ароматических оснований во внутримолекулярном комплексе за счет диамагнитного экранирования кольцевых токов в них.

Аналогичное смещение химических сдвигов ароматических протонов и C_1 -протонов колец рибозы в слабое поле наблюдается при повышении температуры, добавлении органического растворителя и понижении рН среды с 8 до 2, что свидетельствует о диссоциации внутримолекулярного никотинамид—аденинового комплекса и о частичном раскрытии молекулы [35, 48, 56]. При низких рН, вероятно, протонируется атом N_1 аденинового кольца, и в случае окисленных форм происходит раскрытие внутримолекулярного комплекса как результат расталкивания положительных зарядов.

Восстановление НАД сопровождается утратой атомом азота положительного заряда и появлением неподеленной пары электронов — возможного акцептора водородной связи. Атом азота из ароматического плоского становится тетраэдрическим, что влечет за собой изменение угла валентной связи $N-C$ между никотинамидным и рибозным кольцом [36].

Данные, полученные Karle методом дифракции рентгеновых лучей, свидетельствуют о планарной конформации гетероцикла в 1,4-дигидроникотинамидах [39]. Karle нашел также, что атом азота амидной группы повернут от атома азота пиридинового кольца в 1,4-дигидроникотинамиде [39]. Существование такого трансoidного конформера определяется стерическими факторами. Планарная группа амидного азота менее сильно отталкивается двумя лежащими вне плоскости гетероцикла 4-Н-атомами метиленовой группы, чем 2-Н-атомом, лежащим в плоскости кольца. Эти представления подтвердились в работе Maggiora и др., нашедших совпадение вычисленных методом молекулярных орбиталей π -электронных дипольных моментов в основном и возбужденном состояниях [41] и измеренных экспериментально Silento с сотрудниками [42] и Kosower [43] (3,89 и 7,2 D для основного и возбужденного состояний).

Данные химических сдвигов в спектрах ЯМР протонов во 2-, 5- и 6-положениях 1-бензил-1,4-дигидроникотинамида [44] и вычисленные величины электронных плотностей при этих атомах [41] также показали зависимость, характерную для *транс*-конформации.

Однако в последней работе Oppenheimer и др. [172] для дигидропиридинового кольца в динуклеотидах предлагается не плоская, а несколько искаженная «лодкоподобная» конформация. Известно, что два атома водорода в положении 4 дигидроникотинамидного кольца НАДН различаются химически [29, 40]. В работах, посвященных изучению струк-

туры НАДН методом ЯМР, были использованы спектрометры с рабочей частотой 220 мгц. Это позволило установить, что геминальные C_4 протоны дигидроникотинамидного кольца различаются и магнитно. Этот факт объясняет существование двух типов дегидрогеназ в соответствии с неэквивалентностью электронного и геометрического окружения C_4 -протонов — C_4A и C_4B . Существует различие между спин-спиновыми константами пиридиновых C_4A и B -протонов с пиридиновым C_5 -протоном в НАДН, НАДФН и других восстановленных аналогах [172]. Для β -НАДН J_{5-4B} 2,5 гц, J_{5-4A} 3,6 гц при 20° С. Это различие в константах авторы связывают с «лодкоподобной» конформацией дигидропиридинового кольца, в котором В-протон расположен экваториально, а А — аксиально. Такая структура имеет место в сложенной конформации (конформациях) динуклеотида; вклад ее в соответствующих моонуклеотидах (в β -НМНН J_{5-4B} 3,4 гц, J_{5-4A} 3,4 гц) и динуклеотидах при высокой температуре или в спирте несуществен. Эти данные показывают, что в НАДН и его аналогах в сложенной конформации (или конформациях) C_4B -протон приближен к адениновому кольцу, а C_4A -протон удален от него. Однако при такой неплоской конформации дигидропиридинового кольца В-протон испытывает большое диамагнитное дезэкранирование по отношению к А-протону благодаря соседним одинарным С—С связям и двойным связям кольца. Этот эффект прямо противоположен влиянию кольцевого тока соседнего аденинового кольца. Из-за больших противоположных эффектов различие в химических сдвигах H_A - и H_B -протонов невелико. Возможно, этим объясняется существование одного широкого сигнала для C_4H_2 -протонов в спектре ацетильного аналога НАДН в его сложенной конформации [47, 172].

Геминальные C_4 -протоны дигидропиридинового кольца НАДН, НАДФН, НГДН дают АВ-квартет, что указывает на их различное электронное и геометрическое окружение [37, 47]. Сигналы C_4 -протонов НАДН по сравнению с соответствующими дигидроникотинамидмоонуклеотидами, за исключением НГДН, расположены в области более сильных полей, что доказывает наличие значительного внутримолекулярного взаимодействия между гетероциклическими основаниями. Вследствие «разворачивания» молекулы НАДН при повышении температуры с 5 до 74° АВ-квартет вырождается в синглет, смещается в область слабых полей и появляется вблизи сигнала C_4 -протонов дигидроникотинамидмоонуклеотида.

Представление Sarma и Karlap [47] о модели НАДН, существующей в водном растворе в виде двух сложных конформеров, соответствующих Р- и М-спиралям по номенклатуре, предложенной Чап и др. [46], было подвергнуто справедливой критике Jacobus [171].

В случае медленного обмена между Р- и М-спиралями все сигналы должны быть удвоены, что не наблюдается в

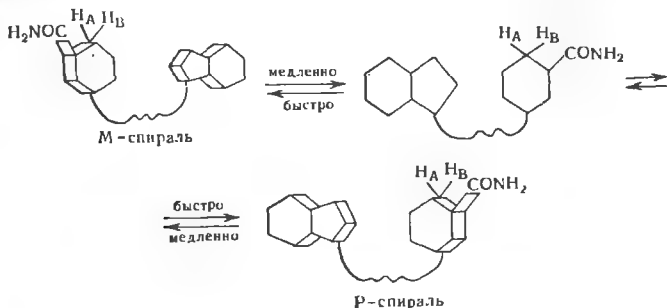


Рис. 2. Схематическое изображение состояния равновесия между Р- и М-спиральными формами НАДН в водном растворе [47].

экспериментальных спектрах. Повторное исследование специфического дейтерирования H_A - и H_B -протонов показало, что в НАДН и его аналогах наблюдается быстрый обмен между их различными конформациями, так как все сигналы появляются в виде отдельных пиков в результате быстрого усреднения всех конформаций. Было показано [179], что неэквивалентные изомерные аддукты НАД-CN- имеют различные ПМР спектры в водных растворах — большинство сигналов удвоено, что находится в согласии со стереохимическими рассуждениями.

Неправильное отнесение некоторых сигналов в спектре ПМР восстановленных динуклеотидов привело Sarma и Karlap [45, 173] к ошибочному представлению о взаимной ориентации оснований друг относительно друга в некоторых случаях, а также об изменении конфигурации рибозы при восстановлении никотинамидного кольца. Это относится прежде всего к отнесению сигналов протонов при C_6 и C'_1 пиридинового кольца. Правильное отнесение сигналов этих протонов, определение констант спин-спинового взаимодействия между протонами в кольцах рибозы, присоединенных к адениновому и пиридиновому кольцам в окисленных и восстановленных динуклеотидах, показало [177], что кон-

фигурация рибозы, присоединенной к пиридиновому кольцу, меняется мало при восстановлении (в противоположность старым представлениям [45]).

Константы спин-спинового взаимодействия рибозных протонов

	При адениновом кольце			При пиридиновом кольце		
	$J_{1', 2'}$	$J_{2', 3'}$	$J_{3', 4'}$	$J_{1', 2'}$	$J_{2', 3'}$	$J_{3', 4'}$
НАД	5,5	5,0	4,5	5,4	6,1	2,3
НАДН	5,5	5,5	3,8	7,5	4,0	—
НМН	—	—	—	5,8	5,2	8,0
НМНН	—	—	—	7,1	5,4	2,1
АМФ	5,5	5,8	5,9	—	—	—

Конфигурация рибозы также не меняется у аденинового цикла и в обоих случаях является C'_3 -экзо- C'_4 -эндо. При восстановлении НАД сигналы рибозных протонов пиридинового цикла смещаются в сторону сильного поля (C'_1 —Н на 1,4 м.д.) в результате потери положительного заряда у азота и образования неароматического дигидропиридинового кольца.

В работе Miles, Urry методом циркулярного дихроизма было показано, что НАДН находится в свернутой конформации [51]. Переход 215 нм дигидроникотинамида связан с переходом 260 нм аденина. При добавлении диоксана или повышении температуры интенсивность полосы 215 нм возрастала примерно на одну и ту же величину. Это свидетельствует о том, что основания в молекуле НАД расположены в непосредственной близости друг к другу и взаимодействуют. Отсутствовало взаимодействие переходов 215 нм дигидроникотинамида и 210 нм аденина. Эти две полосы аденина имеют направления моментов перехода, примерно перпендикулярные друг другу. Так как переход 215 нм связан с переходом 260 нм и не связан с переходом 210 нм, а моменты перехода перпендикулярны друг другу, следует предположить скорее жесткую конформацию НАДН. Эта жесткость еще более возрастает при связывании с белками. Известно, что флюоресценция НАДН становится сильно поляризованной при взаимодействии с аподегидрогеназами [38, 52—54].

Многочисленные данные о структуре НАД были получены при изучении свойств его аналогов. Так, для 5-аминоникотинамидадениндинуклеотида наблюдается усиление флюоресценции с уменьшением рН, что свидетельствует об

уменьшении внутримолекулярного взаимодействия в подтверждение данных, полученных Karlap и др. методом ЯМР [20, 35]. Кривая титрования имеет точку перегиба, соответствующую рН 3,7. Ниже рН 3,7 аналог приобретает дополнительный заряд, что вызывает раскручивание молекулы в результате электростатического отталкивания. При этом исчезает взаимодействие никотинамидной и адениновой компонент, о чем свидетельствует разница в флюоресценции 5-аминоникотинамидадениндинуклеотида и 5-аминоникотинамидрибозы: выход флюоресценции для динуклеотида примерно в 3 раза ниже, чем для рибозида. Кроме того, спектр поглощения рибозида имеет максимум при 343 нм, в то время как 5-аминоникотинамидадениндинуклеотид — при 348 нм. Такое смещение максимума при удалении аденинового остатка из молекулы, возможно, обусловлено $\pi \rightarrow \pi^*$ -взаимодействием в НАД [55]. Карбоксамидная группа, обладая сильным электронооттягивающим действием на пиридиновое кольцо, обуславливает более чем 5-кратное уменьшение флюоресценции. Замена N-метильной группы на более эффективный электронооттягивающий остаток рибозы приводит к подобному эффекту, вероятно, вследствие индуктивного эффекта атомов кислорода рибозного цикла на распределение электронов в никотинамидном кольце.

Таким образом, представление о том, что в растворе НАД существует в свернутой конформации, допускающей внутримолекулярное взаимодействие между гетероциклическими системами, в настоящее время не вызывает сомнений. Для другого кофермента, флавинадениндинуклеотида, сходного с НАД по структуре и функции, получены аналогичные данные (см. в этой книге статью Е. Д. Хомутовой).

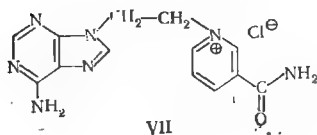
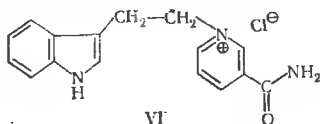
Для НАД остается неизвестной конформация кофермента при его связывании в активном центре дегидрогеназ. Основной вклад в расшифровку этого трудного вопроса, как можно ожидать, будет сделан с помощью таких прямых методов, как рентгеноструктурный анализ и ЯМР. Работы в этом направлении, начатые в 1968—1970 гг. группами Rossmann и Karlap, позволили получить первые данные, свидетельствующие о развернутой структуре НАД в активном центре лактатдегидрогеназы.

• Для того чтобы найти правильный путь решения таких вопросов связывания НАД, как точки присоединения, типы и количество связей, необходимо иметь четкое представление о природе сил, обуславливающих свернутую конформацию молекулы самого НАД в растворе. Если действительно

связывание НАД происходит в его раскрытой конформации, то именно эти силы (но, вероятно, не только они) будут ответственны за образование комплекса НАД-фермент.

Из данных ЯМР энергия образования внутримолекулярного комплекса НАД оценивается в $\sim 1,0$ ккал/моль [56]. Из-за стерических препятствий возможный вклад водородной связи между карбоксамидной группой никотинамидного кольца и атомами азота гетероцикла, аминогруппой аденинового кольца, а также пирофосфатной группой в свернутой конформации НАД представляется незначительным. Взаимодействие гетероциклических оснований скорее всего заключается в образовании комплекса с переносом заряда (КПЗ).

Акцепторные свойства пиридиниевых солей в реакциях образования КПЗ как модельных соединений были подробно исследованы Kosower [57] и Shifrin [58] с использованием в качестве доноров электронов неорганических ионов и боковых цепей аминокислот. Shifrin [59] нашел, что β -(индолил-3)этилникотинамид (VI) обладает интенсивно желтым цветом. В дифференциальном спектре (VI) по сравнению со смесью триптамина и N' -этилникотинамида присутствовала диффузная полоса поглощения в области 300—450 нм с максимумом при 310—330 нм и коэффициентом экстинкции 1000. В этом соединении индольное кольцо выступает в качестве донора [60]. Удлинение углеводородной цепи, связывающей гетероциклы (VI), до пропиленовой не влияло ни на положение максимума поглощения предполагаемого комплекса с переносом заряда, ни на интенсивность поглощения. Перенос заряда отсутствовал в восстановленной форме (VI), 1-[β -(индолил-3)-этил]-1,4-дигидроникотинамиде, в то время как был обнаружен перенос энергии возбуждения электронов: спектр возбуждения флуоресценции имел максимум при 280 и 340 нм. Вся энергия,



поглощаемая индолом, переносилась на флюоресцирующий дигидроникотинамид [58].

Известно, что в некоторых случаях ориентация гетероциклов не имеет существенного значения для переноса заряда. Уайт показал, что образование внутримолекулярного комплекса с переносом заряда между ароматическими системами *п*-нитрофенильного (акцептор) и *п*-аминофенильного (донор) остатков не зависит от геометрического взаимного расположения колец [61].

Образование комплекса с переносом заряда с участием пиридиниевых солей в качестве акцептора может осуществляться межмолекулярно. Cilento, Schreier нашли, что *N*-бензилникотинамид образует комплекс в соотношении 1 : 1 с аденозином или аденозиндифосфатом, обнаруживаемый по появлению полосы поглощения в ультрафиолетовом спектре, в то время как *N*-бензил-1,4-дигидроникотинамид не взаимодействует с аденозином. Аналогичный комплекс образуется с индолом и его производными [62]. 1-Бензилникотинамид образует также КПЗ с НАДН, но не с НАД, вероятно, вследствие того, что кольца аденина и никотинамида в молекуле последнего взаимодействуют друг с другом также с переносом заряда [62]. Данные об образовании КПЗ 1-алкилникотинамида с аденозином, адениловой кислотой, АДФ и АДФ-рибозой были затем подтверждены Anderson, Reynolds [63]. Попытка Shifrin обнаружить КПЗ между никотинамидным и адениновым кольцами, соединенными этиленовым мостиком (VII), была неудачной [58]. Квантово-химический расчет энергии наивысших молекулярных орбиталей показал, что аденин должен быть более эффективным донором электронов, чем индол [64]. Shifrin не обнаружил новой полосы поглощения в спектре (VII). Было установлено, что полуширина полосы поглощения (VII) значительно больше, чем в случае эквимольной смеси 9-(2-хлорэтил)-аденина и *N*-этилникотинамида. Если переход с переносом заряда и существует, то соответствующая полоса расположена весьма близко к главным полосам индивидуальных хромофорных групп.

Описаны два типа взаимодействия между НАД и НАДН: образование комплекса с переносом заряда и перенос энергии возбуждения электронов. Haustein, Hatefi показали, что при 77°K образуется окрашенный комплекс НАД—НАДН (1 : 1) с константой диссоциации $K = 175 \text{ M}^{-1}$ [65]. Аналогичным образом взаимодействуют никотинамидмононуклеотид и НАДН. Смесь НАД и НАДН не дает сигнал

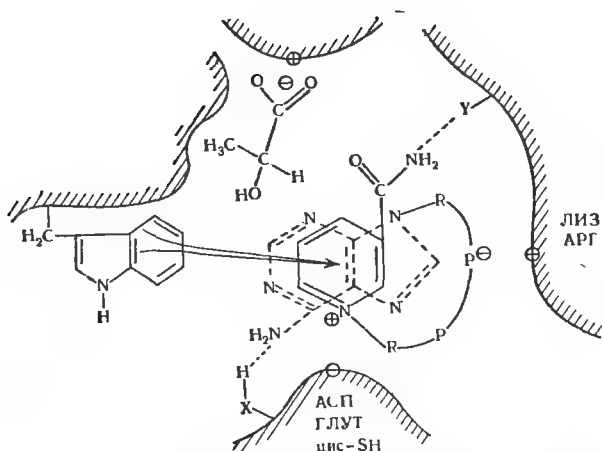


Рис. 3. Возможные точки связывания НАД и субстрата (пирувата) в активном центре дегидрогеназ.

ЭПР, что исключает возможность наличия в ней свободных радикалов и свидетельствует в пользу образования комплекса с переносом заряда. Наблюдается также межмолекулярный перенос энергии возбуждения электронов с аденозина (но не фосфатов) на дигидроникотинамидную компоненту НАДН.

Рассмотрение молекулы НАД (рис. 3) позволяет оценить возможные точки, по которым происходит связывание с белком, и определить наиболее целесообразный путь поиска функциональных групп, ответственных за связывание и катализ. Остаток пироглутаровой кислоты обладает сильным анионным характером. Комплементарный ему положительно заряженный участок НАД-связывающей области скорее всего представлен аминокислотой лизина или гуанидиновой группой аргинина. Положительно заряженный атом азота пиридинового цикла связывается с соответствующим участком, в качестве которого могут выступать карбоксильные группы остатков дикарбоновых кислот и меркаптидная группа цистеина. На первой стадии связывания НАД в активном центре дегидрогеназ важную роль играют, по-видимому, именно силы электростатического взаимодействия, как наиболее дальнедействующие и прочные. Следует также учитывать перенос заряда с индольного кольца остатка триптофана на никотинамидную компоненту НАД при рассмотрении механизма действия конкретных дегидрогеназ,

так как, несмотря на незначительную прочность такого рода комплексов, их образование может существенно сказаться на реакционной способности кофермента. Можно также предположить участие в связывании амидной и аминок групп НАД путем образования водородных связей с соответствующими группами белка X и Y. В активном центре дегидрогеназ должен, вероятно, существовать еще один катионный участок, связывающий карбоксильные группы субстратов и ингибиторов, а также гидрофобная область, в которой закрепляется алкильный радикал субстрата. Неполарный характер гетероциклических колец молекулы НАД позволяет также предположить наличие четко выраженной гидрофобности активного центра.

Функциональные группы дегидрогеназ

Одним из важных направлений исследования механизма действия дегидрогеназ является изучение природы функциональных групп активного центра, участвующих в связывании кофермента и субстратов и в катализе. Невозможно без точного знания групп, образующих так называемые якорные площадки субстрата и кофермента, а также групп, принимающих участие непосредственно в каталитическом акте, последовательно и достоверно описать многостадийную ферментативную реакцию.

Известно большое число работ, посвященных функциональным группам дегидрогеназ, однако не все из них носят систематический характер. Довольно подробно изучены сульфгидрильные группы дегидрогеназ — типичных SH-ферментов. Известно, что фермент-коферментный комплекс диссоциирует под действием SH-реагентов, а кофермент обладает защитным действием при инактивации п-хлормеркурибензоатом. Это позволило предположить взаимодействие положительно заряженного атома азота пиридиниевого цикла НАД с SH-группой активного центра лактатдегидрогеназы [52].

При связывании 4 молей п-хлормеркурибензоата с 1 молем лактатдегидрогеназы ферментативная активность полностью подавлялась. При этом отсутствовали изменения оптического вращения, выхода флюоресценции и седиментационных характеристик. Цистеин обладал способностью реактивировать фермент [66].

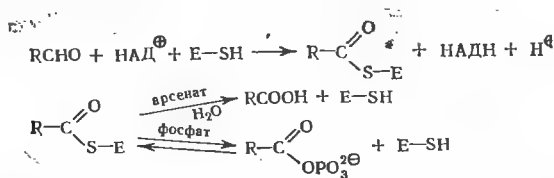
Eisele, Wallenfels [67] нашли, что глицерофосфатдегидрогеназа инактивируется α -L-йодпропионовой кислотой в 6,8 раза быстрее, чем D-формой реагента, что свидетельст-

вует об индуцированном образовании структуры активного центра фермента.

В глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе нуклеофильность SH-групп, т. е. скорость их алкилирования, возрастает при действии йодуксусной кислоты в присутствии НАД. Для этого фермента предполагается существование SH-группы в виде сульфид-иона, который располагается вблизи положительно заряженного атома азота пиридиниевого кольца и отдает свой электрон π -электронной системе кольца, образуя комплекс с переносом заряда. Из зависимости константы скорости бимолекулярной реакции от pH величина рК диссоциации группы, реагирующей с йодуксусной кислотой, определена равной 5,4 [68].

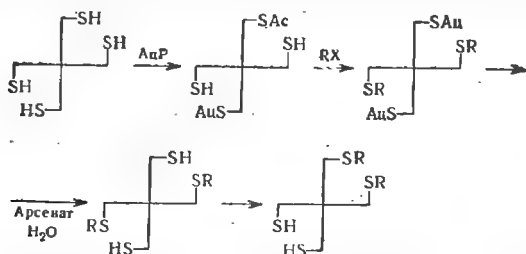
Найденная величина рК диссоциации SH-группы глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы значительно отличается от рК диссоциации алкилмеркаптанов (8,4—8,8). Это не является необычным, так как известно, что диссоциация функциональной группы белка зависит от окружения в белковой молекуле и влияния других функциональных групп.

В отличие от других НАД-зависимых дегидрогеназ, катализирующих только реакции окисления — восстановления, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа катализирует окислительное фосфорилирование *D*-глицеральдегид-3-фосфата в реакции, протекающей в две стадии:



На первой стадии альдегид стехиометрически реагирует с ферментом с образованием тиаэфира, который деацилируется на 2-й стадии арсенат- или фосфат-ионом с образованием карбоновой кислоты либо ацилфосфата соответственно. Известно, что первые 2 из 4 молекул НАД связываются весьма прочно, в то время как 2 последующие с прогрессивно убывающей прочностью [69, 70]. Блокирование 4 SH-групп/моль фермента с помощью йодуксусной кислоты или ее амида приводит к полной инактивации. Как уже указывалось, скорость реакции инактивации йодуксусной кислотой в присутствии НАД увеличивается примерно в 8 раз, а йодацетамидом — уменьшается в 2 раза [71]. Следова-

тельно, блокируемые SH-группы фермента находятся в катионном окружении. Интересно, что количество алкилируемых SH-групп, ответственных за сохранение ферментативной активности, в 2 раза меньше тех SH-групп, которые ацилируются хромоформным субстратом — β -(2-фурил) акрилоилфосфатом [72]. Так как скорость деацилирования β -(2-фурил) акрилоилфермента почти в 100 раз меньше, чем 3-фосфоглицерилфермента, это позволяет использовать субстрат в течение коротких промежутков времени в качестве необратимого ингибитора, аналогично галоидоалкилам. Серия остроумных экспериментов, проведенных Mac Quagrie, Bernhard [73] с использованием йодуксусной кислоты и β -(2-фурил) акрилоилфосфата, а также природного субстрата, 3-фосфоглицерофосфата, позволила авторам предположить следующий механизм реакции. Ацилфермент $(A_cS)_2E(SH)_2$ подвергается действию галоидалкила. При деацилировании диацил-диалкилфермента $(A_cS)_2E(SR)_2$ образуется диалкилфермент $(HS)_2E(SR)_2$ — производное, которое должно обладать 100% активностью в результате освобождения реактивных SH-групп. Оказалось, что активность выделенного производного составляет всего 38%, т. е. примерно ту величину, которая получается при модифицировании фермента двумя эквивалентами галоидалкила (50%). Скорость деацилирования $(A_cS)_2E(SR)_2$ и $(A_cS)_2E(SH)_2$ была идентична. Полученные результаты объясняются перегруппировкой внутри субъединиц, приводящей к изменению симметрии молекул фермента.



Для алкилирования SH-групп дегидрогеназ успешно использовались соединения — структурные аналоги ингибиторов, субстратов и коферментов. Например, van Eys и др. описали аналог НАД (4-метил-5-оксиэтил)тиазоладениндинуклеотид, ковалентно связывающийся в активном центре α -глицерофосфатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы печени лошади путем взаимодействия с существенной

SH-группой [74]. В этом соединении кольцо четвертичного тиазола раскрывается при умеренно щелочных значениях pH с образованием меркаптана. В присутствии окислителя, феррицианида, аналог ковалентно связывается с ферментом в количестве 2 моля на 1 моль белка. Аналог легко удалялся при действии меркаптоэтанола.

Несмотря на внешнюю привлекательность исследований с ковалентно связывающимися аналогами субстратов и коферментов, требуется осторожность в интерпретации результатов. Блокируемая функциональная группа может быть расположена вне соответствующего участка специфического связывания.

Алкилирование SH-групп лактатдегидрогеназы сердца свиньи с помощью малеимида сопровождалось падением ферментативной активности, причем вплоть до 97% инаktivации полученное производное фермента имело величину K_M , практически не отличающуюся от величины K_M нативного фермента [75]. Полностью инаktivированный фермент связывал НАДН и комплекс НАД-сульфит с такой же легкостью, как и нативный фермент. Все это позволяет говорить о том, что существенные SH-группы лактатдегидрогеназы не принимают участия в связывании кофермента. Защитный эффект НАДН в реакции алкилирования свидетельствует о нахождении SH-групп в непосредственной близости к коферментсвязывающему участку.

Исследование роли функциональных групп дегидрогеназ обычно осложнено тем обстоятельством, что большинство реагентов, используемых для модифицирования, взаимодействуют в первую очередь с существенными SH-группами. Для достижения селективного блокирования amino-, имидазольных и карбоксильных групп необходимо поэтому вначале ввести в фермент защитные группировки, обратимо блокирующие SH-группы. Этот прием широко использовался Pfeleiderer и др. Было показано, что лактатдегидрогеназа сердца свиньи может быть обратимо инаktivирована п-хлормеркурбензойной кислотой или 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой, однако реактивация тиолами, такими, как цистеин, глутатион, не является полной [76]. Удачным оказалось применение двуххлористой ртути. Меркурированную лактатдегидрогеназу обрабатывали п-дiazобензолсульфокислотой. Активность полученного реактивированного фермента пропорциональна количеству остатков реагента на молекулу белка, что свидетельствует о значении остатков тирозина и (или) гистидина в механизме действия ЛДГ.

Мора, Elödi подвергали йодированию лактатдегидрогеназу мышц свиньи [77]. При pH 7,0 реакция между SH-группами и йодом была специфична и обратима. Все SH-группы исчезали при инкубации с йодом и почти 90% их восстанавливалось при добавлении меркаптоэтанола или цистеина. Инактивация была обусловлена окислением SH-групп до дисульфидных связей: исчезновение 8 SH-групп на 1 моль лактатдегидрогеназы приводило к полной инактивации. В этих условиях не изменялась конформация белка, так как дисперсия оптического вращения оставалась постоянной.

Südi, Khan [78] показали, что SH-группы лактатдегидрогеназы свиньи (изозимы H₄ и M₄) в отличие от обычных условий легко реагируют с йодацетамидом при замораживании и оттаивании раствора, что, как известно, сопровождается диссоциацией тетрамера на субъединицы.

Флюоресцеинмеркуриацетат реагировал с тремя SH-группами алкогольдегидрогеназы дрожжей. При этом активность фермента падала на 85%, а флюоресценция метки уменьшалась. Цистеин реактивировал до 60% активности [79]. Если 4 существенные SH-группы блокировали вначале йодуксусной кислотой, то при действии флюоресцеинмеркуриацетата титровалось еще 4 SH-группы. Таким образом, 8 SH-групп алкогольдегидрогеназы дрожжей обладали сходной реакционной способностью по отношению к ртутьорганическим соединениям. Блокирование первых 4 SH-групп приводило к изменению конформации фермента (данные получены методом гель-фильтрации), в результате чего становились доступными действию реагента следующие 4 SH-группы. По данным Holbrook, Jeckel, N-(N'-ацетил-4-сульфофенил)малеимид блокирует в глутаматдегидрогеназе при pH 6,9 SH-группу, а при pH 7,3 происходит алкилирование только NH₂-группы [80].

Для лактатдегидрогеназы сердца свиньи было обнаружено интересное явление спонтанной реактивации фермента, инаktivированного п-хлормеркурибензоатом [76]. Это объяснялось внутримолекулярным тиолдисульфидным обменом, в результате которого остаток реагента переносится с существенной SH-группы на соседнюю с ней SH-группу.

Описано модифицирование SH-групп лактатдегидрогеназы 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой [81] и N,N-диметиламидо-3,5-динитрофенилмалеимидом [82].

Pfleiderer с сотрудниками модифицировали лактатдегидрогеназу 3-бромацетилпиридиний бромидом. При этом бло-

кировалась одна SH-группа и один остаток гистидина [83]. Выделенный частично активный фермент обладал более низкой величиной $V_{\max}$ по сравнению с нативной лактатдегидрогеназой, в то время как величина K_M оставалась неизменной. Параллельно инаktivации происходило также уменьшение способности связывать комплекс НАД-сульфит. Если вначале проводили защиту SH-групп с помощью $HgCl_2$, то блокировался только остаток гистидина. В присутствии НАД и АДФ скорость реакции инаktivации снижалась, в то время как никотинамидмононуклеотид практически не обладал защитным эффектом. Интересно, что блокирование SH-групп лактатдегидрогеназы сердца свиньи под действием 1-карбэтокси-3-бромацетилпиридиний бромида ускорялось в присутствии НАД [84, 139].

В малатдегидрогеназе цитоплазмы сердца свиньи при действии йодуксусной кислоты протекала реакция алкилирования с константой скорости $K=0,022 \text{ M}^{-1} \text{ мин.}^{-1}$ [85]. Скорость реакции не менялась в интервале pH 6,0—9,0, из чего следовало, что алкилируется электронейтральный аминокислотный остаток. Им оказался остаток метионина, существенный для проявления ферментативной активности.

Галюидсодержащий аналог субстрата, 2-бром-2-фенилацетальдегид, блокировал в алкогольдегидрогеназе дрожжей 3—4 SH-группы. При этом НАД оказывал защитное действие. Выделенный модифицированный фермент сохранял способность связывать НАДН [86].

SH-группы активного центра алкогольдегидрогеназы дрожжей необычны в реакции с йодацетамидом: скорость реакции не зависит от величины pH среды в области pH 6,0—10,0 [55]. Было предположено, что SH-группы участвуют в образовании водородных связей, возможно, с имидазольными группами. Другой возможностью является принадлежность SH-групп, которые алкилируются, комплексу меркаптид-цинк. Но так как карбоксиметилирование уменьшает скорость обмена цинка в активном центре алкогольдегидрогеназы, эта возможность маловероятна [87].

Было высказано предположение, что существенная SH-группа алкогольдегидрогеназы дрожжей расположена вблизи атома цинка и аденинсвязывающего участка [88].

Сульфидная группа остатка цистеина ($-S-$) может взаимодействовать с карбонильной группой субстрата. Об этом свидетельствуют данные модельной реакции цистеина с диоксиацетонфосфатом и пируватом: при этом образуются соответствующие тиополукетали. Показано, что эти сое-

динения конкурируют с субстратами лактатдегидрогеназы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [89].

В глюкозо-6-фосфатдегидрогеназе из *Candida utilis* найдены существенные остатки аргинина [90]. При действии 1,2-циклогександиола вначале блокировалось 12 из 45 остатков аргинина без потери активности, но модифицирование последующих 3—4 остатков вызывало инактивацию. В этом ферменте 2 из 34 остатков тирозина ответственны за проявление активности. Реакция их с N-ацетилимидазолом и тетранитрометаном приводит к инактивации [91].

Имидазольным кольцам остатков гистидина дегидрогеназ в более ранних работах приписывалась способность выполнять функции доноров-акцепторов в окислительно-восстановительных реакциях.

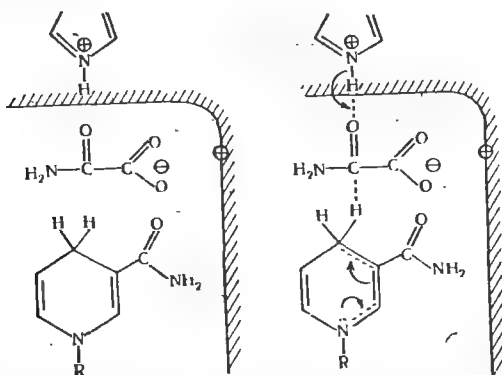


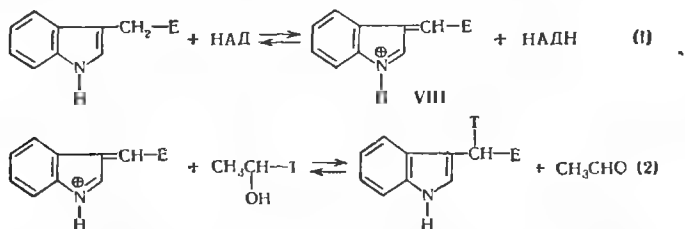
Рис. 4. Функционирование имидазольного кольца гистидина в активном центре лактатдегидрогеназы [53].

Winer, Schwert [92] на основании данных зависимости от pH скорости окисления лактата пришли к выводу о том, что в активном центре лактатдегидрогеназы функционирует группа с pK 7,0. Вероятно, это имидазольная группа гистидина, которая протонируется при превращении пирувата в лактат и депротонируется при обратной реакции.

Было высказано мнение, что гашение флюоресценции фермент-коферментного комплекса, наблюдаемое при связывании оксамата, обусловлено стабилизацией дигидрокотинамидного кольца кофермента в структуре, сходной с окисленной формой (рис. 4), которая не флюоресцирует [53]. Интересно, что оксалат, наоборот, усиливает флюоресценцию комплекса лактатдегидрогеназа-НАДН, что было

объяснено наличием в таком тройном комплексе второго аниона, находящегося в непосредственной близости к положению 4 дигидроникотинамидного кольца. Это, по-видимому, обуславливает его более хиноидный характер.

Интересными представляются данные о роли остатков триптофана в механизме действия дегидрогеназ. Из работ Westheimer, ставших классическими, следовало, что в активном центре дегидрогеназ осуществляется прямой перенос водорода с субстрата на кофермент [49, 93, 94]. Вместе с тем автор не исключал того, что в роли промежуточного переносчика может выступать какая-либо функциональная группа белка. Ответ на вопрос о таком участии белка в реакции был, казалось, получен в работах Schellenberg [95—97]. В результате исследования реакций, катализируемых алкогольдегидрогеназой дрожжей и лактатдегидрогеназой, была выдвинута гипотеза об участии специфических остатков триптофана в окислительно-восстановительных реакциях путем обратимого дегидрирования с образованием производного индоленина (VIII).

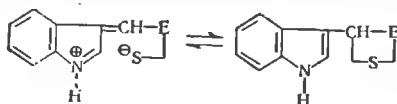


Из реакционной смеси, содержавшей дегидрогеназу, этанол, меченный тритием по 1-углеродному атому, и НАД, был выделен белок, денатурированный мочевиной. Меченый белок подвергали щелочному гидролизу и затем выделяли триптофан, содержавший до 30% метки. Предварительная обработка N-бромсукцинимидом, реагентом, разрушающим остатки триптофана в белках, препятствовала включению метки в белок. Отсутствие включения при блокировании SH-групп ионами Ag^+ позволило предположить также участие этих групп в реакции.

После опубликования этих данных Colowick писал: «Это сообщение явилось полным сюрпризом для тех из нас, кто воспринимал как догму принцип прямого переноса водорода с субстрата на кофермент» [98].

Более подробное исследование свойств индоленинов в модельных системах, в особенности их реакций с тиолами,

позволило Schellenberg предположить стабилизацию постулируемого индоленина на ферменте путем взаимодействия с расположенной поблизости SH-группой [97].



Недавно были высказаны сомнения по поводу схемы реакций, предложенных Schellenberg (1, 2). О способности остатков триптофана окисляться до иона индоленина, т. е. о существовании восстановленной формы фермента, можно было бы судить по протеканию реакции изотопного обмена в системе ацетальдегид—этанол (C^{14}) в отсутствие кофермента. Это обнаружено не было в работе Wong, Williams [99]. По-видимому, остатки триптофана не принимают участия в катализе на промежуточных стадиях, но связывание кофермента и субстрата приводит к лабильзации триптофана, в результате которой при денатурации и выделении белка происходит включение метки в метиленовую группу триптофана. Эти результаты согласуются с данными Карлап, не обнаружившего ферментативный обмен между окисленной и восстановленной формами кофермента в отсутствие субстратов [100].

Данные о включении метки в остатки триптофана дегидрогеназ подтверждают сделанные ранее предположения о возможном взаимодействии НАД с остатками триптофана [101, 102]. Такой вывод был сделан в результате исследования флюоресценции НАДН, связанного с ферментом [38]. Как видно из спектра возбуждения (рис. 5), НАДН имеет максимумы при 270 и 350 нм, что соответствует полосам поглощения 260 и 340 нм. В спектре НАДН, связанного с ферментом, появляется интенсивный максимум при 290 нм в области, где НАДН поглощает весьма незначительно, а

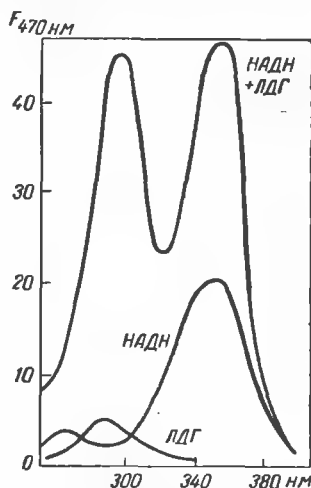


Рис. 5. Спектры возбуждения ЛДГ, НАДН и комплекса ЛДГ-НАДН [38].

адсорбция белка максимальна. Это позволило сделать вывод о переносе энергии возбуждения с ароматических остатков аминокислот на связанный НАДН.

Участие ϵ -аминогруппы лизина фермента было предположено Kosower для объяснения эффекта Бойера — Теорелла — коротковолнового сдвига максимума в спектре поглощения НАДН при связывании алкогольдегидрогеназой печени лошади [103, 104]. Для этого фермента предполагается, что такой эффект может вызывать ϵ -аминогруппа лизина активного центра (рис. 6). Она образует водородные

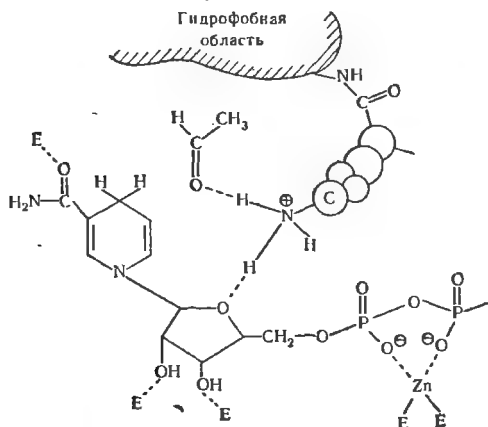


Рис. 6. Функционирование ϵ -аминогруппы лизина в активном центре алкогольдегидрогеназы [103].

связи с атомами кислорода альдегидной группы и кольца рибозы, к которому присоединен дигидроникотинамидный цикл. Это обуславливает сближение молекул субстрата и кофермента, благоприятствующее протеканию последующей окислительно-восстановительной реакции. ϵ -Аминогруппа находится на расстоянии примерно 3 Å от атома азота пиридинового кольца, чему должна соответствовать энергия перехода в 5,2 ккал. Эта величина согласуется с экспериментальными данными сдвигов комплексов НАДН-фермент: величина энергии перехода составляет 3,3—3,9 ккал/моль.

В реакции гидролиза п-нитрофенилацетата, катализируемой глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой, происходит ацетилирование аминогруппы лизина, что препятствует связыванию НАД [105—107]. Это обосновало работу по

поискам аминокруппы в активном центре фермента, ответственной за связывание НАД. Однако пиридоксаль-5'-фосфат, реагируя с аминокруппами, слабо ингибировал активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, причем конкуренция с НАД в этом случае отсутствовала [108]. Установлено, что в ходе реакции гидролиза п-нитрофенилацетата происходит перенос ацетильной группы с реактивной SH-группы остатка лизина цистеина-149 на аминокруппу остатка лизина-183 [109, 110]. Остается, однако, неясным, происходит ли перенос ацетильной группы между субъединицами или в пределах одной субъединицы. Пиридоксаль-5'-фосфат обратимо ингибирует также и некоторые другие дегидрогеназы [111, 112].

В работе [113] было исследовано взаимодействие лактатдегидрогеназы с динитрофторбензолом. Оказалось, что при этом легко наступает инактивация, причем НАД практически не оказывает защитного действия. Сульфит защищал слабо, в то время как в присутствии аддукта НАД-сульфит скорость ингибирования существенно снижалась.

По данным Pflieger, от 15 до 26 аминокрупп лактатдегидрогеназы блокируются ацетилимидазолом без потери активности [114].

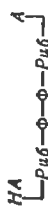
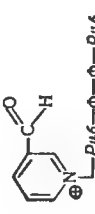
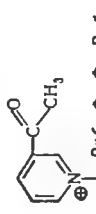
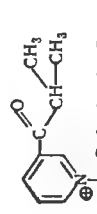
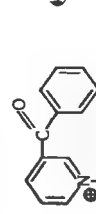
Блокирование примерно 4 аминокрупп с помощью данзилхлорида (1-диметиламинонафталин-5-сульфохлорида) не вызывало изменения активности лактатдегидрогеназы быка (изозим M₄) [115].

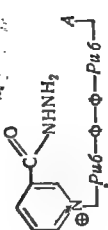
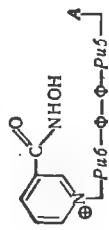
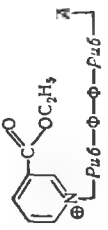
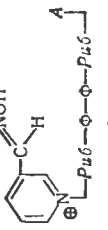
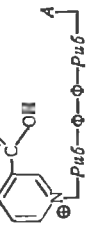
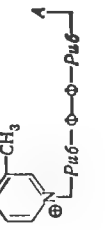
Таким образом, для большинства дегидрогеназ участие функциональных групп, имеющих значение для проявления ферментативной активности, представляется неясным. Известно, что успех может быть достигнут в тех случаях, когда функциональная группа участвует в образовании фермент-субстратного комплекса, в котором субстрат или его фрагмент связаны ковалентно. В общем случае это значительно облегчает последующую расшифровку стереических особенностей активного центра, взаимодействия существенной функциональной группы с другими группами в ходе катализа.

Можно ожидать, что создание в будущем аналогов субстратов и кофермента, содержащих реакционноспособные группировки, способные ацилировать или алкилировать функциональные группы активного центра, позволит ответить на многие важные вопросы механизма действия дегидрогеназ.

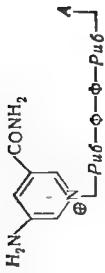
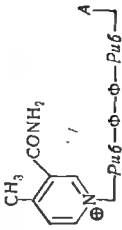
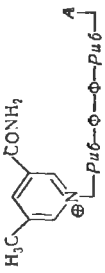
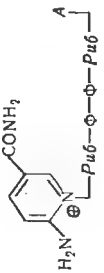
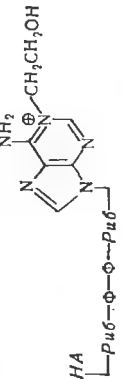
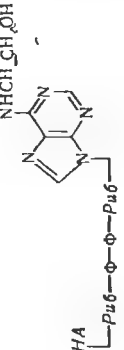
Таблица 1

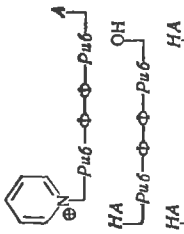
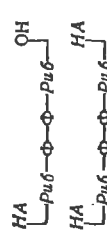
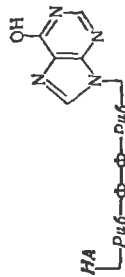
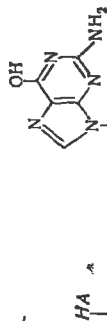
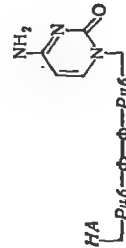
Коферментная активность аналогов НАД [25, 26, 118—125]

№ п.п.	Соединение, формула	Активность, %			
		ДАДГ	ПАДГ	ЛДГ, Н ₄	ЛДГ, М ₄
1	β-Никотин-амидаденин-динуклеотид 	100	100	100	100
2	α-Никотин-амидаденин-динуклеотид 	—	0,2	—	—
3	3-Пиридин-альдегид-адениндину-клеотид 	2	—	—	—
4	3-Ацетилпи-ридинаденин-динуклеотид 	10	—	—	—
5	3-Изобутироил-пиридинаде-ниндинуклео-тид 	50	792	37 (бык)	125 (кролик)
6	3-Бензоил-пиридинаде-ниндинукле-отид 	0	31	0 (бык)	0 (кролик)

7	Никотинил-гидразид-адениндинуклеотид		8	68	9 (бык)	38 (кролик)
8	Никотинил-гидроксамат-адениндинуклеотид		3	44	10 (бык)	20 (кролик)
9	Этиловый эфир никотиновой кислоты — адениндинуклеотид		0	—	—	—
10	Никотинил-альдоксим-адениндинуклеотид		6	50	10	7
11	Никотиновая кислота — адениндинуклеотид		1	—	—	—
12	3-Метилпиридинадениндинуклеотид		—	0	—	—

№ п/п	Соединение, формула	Активность, %			
		ДАДГ	ПАДГ	ЛДГ, H ₄	ЛДГ, M ₄
13	3-Аминопиридинадининуклеотид	0	0	0 (бык)	0 (кролик)
14	3-Пиридилметилкарбиноладининуклеотид	0	—	—	0
15	3-Ацетамидопиридинадининуклеотид	0	0	0 (бык)	0 (кролик)
16	3-Пиридил-акриламид-аденидинуклеотид	0	0	0 (бык)	0 (кролик)
17	Тионикотинамид-аденидинуклеотид	16	348	41	3

18	5-Аминони- котинамид- адениндинук- леотид		—	0	—	—
19	4-Метилни- котинамид- аденинди- нуклеотид		—	0	—	—
20	5-Метилни- котинамид- аденинди- нуклеотид		—	0	—	—
21	6-Аминони- котинамид- аденинди- нуклеотид		—	—	0,1	—
22	Никотин- амид-1- (2'-окси- этил)-аде- ниндину- клеотид		0,2	2	2	0,5 (кролик)
23	Никотин- амид-6- (2'-оксиэтил- амино)-пу- риндину- клеотид		44	82	52	104 (кролик)

№ п/п	Соединение, формула	Активность, %				
		ДАДГ	ПАДГ	ЛДФ, H ₄	ЛДГ, M ₄	
24	Пиридин-аденидинуклеотид 	0	—	—	—	
25	Никотин-амидрибозафосфатрибоза 	0	—	—	—	
26	Диникотин-амиддинуклеотид 	50	—	—	—	
27	Никотин-амидгипоксантидинуклеотид 	0	—	—	—	
28	Никотин-амидгуанидинуклеотид 	10	—	—	90 (кролик)	
29	Никотин-амидцитозиндинуклеотид 	4	—	—	80 (кролик)	

30	Никотин-амидура-цилиндуклеотид		1	75	71 (бык)	80 (кролик)
31	Никотин-амидтимин-динуклеотид		—	—	1 (бык)	15 (кролик)

Величины активности выражены в процентах по отношению к активности β-никотирамидаденилиндуклеотида. Сокращения: ДАДГ — алкогольдегидрогеназа дрожжей; ПАДГ — алкогольдегидрогеназа печени лошади; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; Н₄ и М₄ — изоферменты; Риб — остаток рибозы; Ф — остаток фосфорной кислоты; НА — остаток никотинамида; А — остаток аденина.

Связывание и функционирование НАД в активном центре дегидрогеназ

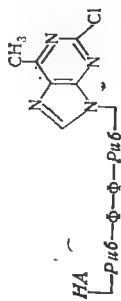
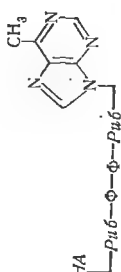
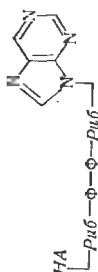
Участие НАД в ферментативных реакциях можно представить как процесс, протекающий по крайней мере в 2 стадии: связывание в активном центре и каталитическое превращение.

Значительная по объему и ценности информация о роли отдельных частей молекулы НАД в связывании и катализе была получена при исследовании коферментной активности аналогов НАД. Данные, имеющиеся в литературе для наиболее изученных аналогов, приведены в табл. 1 и 2.

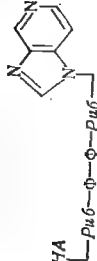
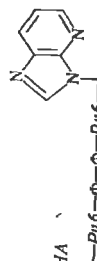
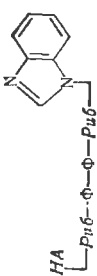
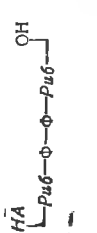
Модифицированы и подвергались как пиридиновый, так и адениновый циклы, а также остатки рибозы и пирофосфатная группа. Наибольший интерес представляет сопоставление коферментной активности аналогов, измененных по пиридиновой части, так как именно она претерпевает превращение в ходе ферментативного катализа. Переход от CONH₂ к CHO группе (3, табл. 1) снижает скорость реакции

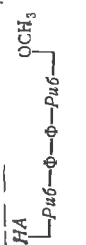
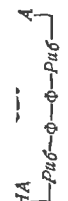
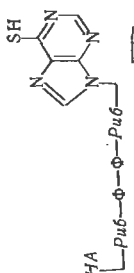
Таблица 2
Кинетические константы, определенные в реакциях, протекающих с участием аналогов НАД [117—129]

Соединение, формула	Алкогольдегидрогеназа				Лактатдегидрогеназа			
	дрожжей		печени лошади					
	K_M'	V_{max}	K_M'	V_{max}	K_M'	V_{max}	K_M'	V_{max}
1. Никотинамидгипоксантиндинуклеотид	—	—	—	—	—	—	1,0·10 ⁻³	13 000
2. Никотинамидпуриндинуклеотид	2,5·10 ⁻⁴	20 000	—	—	—	—	—	—
3. Никотинамид-6-метилпуриндинуклеотид	3,5·10 ⁻⁴	20 000	0,3·10 ⁻⁴	500	—	—	—	—
4. Никотинамид-6-метил-2-хлорпуриндинуклеотид	3,0·10 ⁻⁴	20 000	0,15·10 ⁻⁴	330	—	—	—	—



4 Коферменты

5. Никотинамид-3-дезапуридинуклеотид		15 000	$0,6 \cdot 10^{-4}$	250	$6,2 \cdot 10^{-4}$	20 000
6. Никотинамид-1-дезапуридинуклеотид		4 000	$3,3 \cdot 10^{-4}$	250	$2,8 \cdot 10^{-4}$	15 000
7. Никотинамидбензимидазолдинуклеотид		1 300	$3,7 \cdot 10^{-4}$	200	$6,0 \cdot 10^{-4}$	15 000
8. Никотинамидфеноксидинуклеотид		7 000	$6,0 \cdot 10^{-4}$	240	$8,7 \cdot 10^{-4}$	15 000
9. Никотинамидрибозид-5'-пирофосфат (P2) -5'-рибозид		1 000	$4,0 \cdot 10^{-3}$	100	$6,0 \cdot 10^{-3}$	500

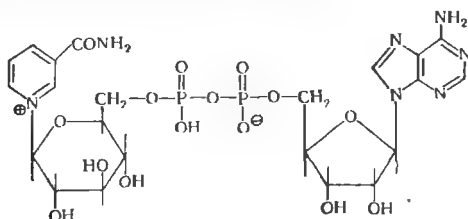
Соединение, формула	Алкогольдегидрогеназа						Лактатдегидрогеназа сердца свиньи	
	дрожжей		печени лошади		V _{max}	K _M , M		
	K _M , M	V _{max}	K _M , M	V _{max}				
10. Никотинамидри- бозид-5'-пирофос- фат-(P ²)-5'-мети- ловый эфир		—	—	5,0·10 ⁻⁴	22	—	—	
11. Никотинамидри- бозид-5'-пирофос- фат-(P ²)-5''-β- цианэтиловый эфир		2,5·10 ⁻⁴	20 000	—	—	—	—	
12. Никотин-амид- адениндинуклео- тид		2,5·10 ⁻⁴	55 000	0,3·10 ⁻⁴	410	0,75·10 ⁻⁴	17 000	
13. Никотинамид-6- меркаптопурин- динуклеотид		6,0·10 ⁻⁴	10 000	—	—	—	—	

почти в 100 раз. Введение COCH_3 -группы (4, табл. 1) приводит к получению несколько более активного аналога (10% по сравнению с НАД). Неожиданным является появление коферментной активности, во много раз превышающей активность НАД при переходе к группе $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ (5, табл. 1). В случае алкогольдегидрогеназы печени лошади скорость реакции возросла более чем в 8 раз. Возможно, этот аналог связывается ферментом прочнее за счет сил гидрофобного взаимодействия группы $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ с неполярной областью активного центра фермента. Следует также иметь в виду возможное участие углеводородных радикалов в качестве доноров электронов в образовании комплексов с переносом зарядов [116]. Введение неполярной, но конформационно менее лабильной по сравнению с группой $\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ COC_6H_5 -группы приводит к почти полностью неактивному аналогу (6, табл. 1), возможно, вследствие стерических препятствий к достижению «рабочей» конформации кофермента. Это следует из того, что такой бензоилпиридиновый аналог НАД, не восстанавливаясь, эффективно связывается с ферментом: он является мощным ингибитором. Аналоги, содержащие вместо CONH_2 -группы, группы CONHNH_2 , CONHOH , COC_2H_5 , $\text{C}(=\text{NOH})\text{H}$ (7—10, табл. 1), обладают некоторой активностью. Аналог с COOH -группой слабо активен (11, табл. 1), вероятно, вследствие наличия в молекуле анионного заряда в непосредственной близости к положению 4 пиридинового кольца, присоединяющего в НАД отрицательно заряженный гидрид-ион. Возможно также, что ионизирующая карбоксильная группа аналога вызывает дезориентацию и деформацию активного центра.

Группы CH_3 , NH_2 , OCH_3 , NHCOCH_3 и $\text{HC}-\text{CHR}$ сообщают пиридиновому циклу более отрицательный окислительно-восстановительный потенциал по сравнению с НАД, что проявляется в уменьшении константы образования аддукта с CN^- -ионом, и приводят к полному исчезновению коферментной активности (12—16, табл. 1). Замена CONH_2 -группы на CSNH_2 приводит в случае алкогольдегидрогеназы печени лошади к возрастанию активности в 3 раза (17, табл. 1).

Введение CH_3 - и NH_2 -групп в 4, 5 или 6 положение пиридинового цикла приводит к неактивным аналогам (18—21, табл. 1). Из этой группы аналогов наиболее интересен 5-амино-НАД, окисленная форма которого флуоресцирует с максимумом возбуждения при 348 нм и максимумом

эмиссии в области 445 нм. О большом значении остатков рибозы свидетельствуют данные, полученные Пфляйдерером с сотрудниками для никотинамид- $N'\beta$ - D — глюкопиранозил-6'-аденидинуклеотида [117]:



Несмотря на высокое сродство к нуклеофильным агентам ($K_{\text{дисс}}$ комплекса с CN^- -ионом $0,5 \cdot 10^{-3}$ М, для НАД — $0,6 \cdot 10^{-2}$ М), этот аналог неактивен в реакциях с алкоголь-, лактат- и глутамат-дегидрогеназой.

Как следует из данных, приведенных в табл. 1 и 2, замена CONH_2 на многие другие группы приводит к получению аналогов, обладающих заметной коферментной активностью. Такой же вывод можно сделать относительно природы заместителя в положении 6 пуринового кольца. Аминогруппа может быть заменена на OH , H или CH_3 -группу без катастрофического падения активности (1—3, табл. 2). Слабо сказывается на величинах кинетических констант введение атома хлора в положение 2 пуринового кольца (4, табл. 2). Алкилирование атома азота пуринового кольца в положении 1 приводит к полной потере активности (22, табл. 1). Этот атом, обладая наибольшей нуклеофильностью, принимает, по-видимому, непосредственное участие в связывании с ферментом. Для фермента другого типа, аденозиндезаминазы, также атому азота в положении 1 пуринового кольца субстрата отводится важная роль на стадии связывания [166—167].

Сохранение значительной коферментной активности при замещении НАД по атому азота — CONH_2 -группы или по положению 6 пуринового кольца делает возможным получение аналогов с различными заместителями в этих положениях с целью последующего их изучения с точки зрения структуры и функции активного центра.

Наибольший интерес представляют собой данные, подробно и дифференцированно описывающие коферментную активность аналогов НАД. Авторы работы [126] определили кинетические константы ряда аналогов. Сравнение ве-

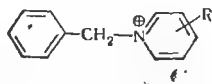
Личин K_M и $V_{\text{макс}}$ показывает (табл. 2), что природа пуринового кольца имеет существенное значение для протекания ферментативных реакций. Удаление аминогруппы и обеднение системы гетероцикла атомами азота сопровождается как уменьшением сродства, так и снижением скорости превращения фермент-субстратного активированного комплекса (2, 5, 6, табл. 2). Тем не менее важно наличие ароматического остатка. Пуриновая система может быть заменена остатком бензимидазола и даже оксифенильным остатком (7, 8, табл. 2). Эти аналоги обладают значительной коферментной активностью. Удаление ароматического остатка и замена его на атом водорода, CH_3 - и $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ -группы сопровождается резким падением прочности связывания и скорости превращения фермент-субстратного комплекса (9—11, табл. 2). Ароматическое кольцо, в частности его π -электронная система, по-видимому, играет важную роль во взаимодействии НАД с белком. Данные, полученные для аналогов НАД, позволяют считать, что в связывании НАД в активном центре дегидрогеназ принимают участие как никотинамидная, так и адениновая компонента.

Этот вывод был подтвержден результатами исследований ингибирующей способности соединений — структурных фрагментов молекулы НАД — производных пиридина и пурина, взаимодействие которых с НАД-связывающей областью должно, по-видимому, происходить по пиридин- и пуринсвязывающим участкам соответственно.

При исследовании производных пиридина, отличающихся природой заместителя в положении 3 оказалось, что с уменьшением электроотрицательности замещающей группы и, следовательно, с возрастанием легкости протонизации атома азота пиридинового кольца степень ингибирования увеличивалась. Карлап наблюдал линейную зависимость величины K_i реакции ингибирования от pK ионизации атома азота [125]. N-Метилпроизводные пиридиновых оснований ингибировали алкогольдегидрогеназу дрожжей конкурентно по отношению к НАД. Это позволило сделать вывод о том, что в области связывания имеется анионный участок, взаимодействующий с положительно заряженным атомом азота никотинамидной компоненты НАД. Отсутствовала конкуренция N-метилникотинамида к НАДН. N-Метилдигидроникотинамид не ингибировал образование комплекса лактатдегидрогеназа-НАДН; не менялась флуоресценция при 470 нм, характеризующая комплекс [52].

Роль заместителя в положении 3 пиридинового кольца была исследована также Anderson на примере N-бензилзамещенных пиридинов [131]. Полученные данные представлены ниже. Все исследованные производные тормозили алкогольдегидрогеназу дрожжей конкурентно по отношению

Ингибирование алкогольдегидрогеназы дрожжей N-бензилзамещенными пиридинами [131]



Заместитель R	K_i , M	Заместитель R	K_i , M
3-CONH ₂	$1,18 \cdot 10^{-2}$	3-CH ₂ CN	$1,34 \cdot 10^{-2}$
3-COOH	$4,38 \cdot 10^{-2}$	3-CH ₂ NH ₂	$0,34 \cdot 10^{-2}$
3-COCH ₃	$1,24 \cdot 10^{-2}$	3-CH ₂ OH	$0,80 \cdot 10^{-2}$
3-CH ₃	$1,16 \cdot 10^{-2}$	3-CH=CHCONH ₂	$0,75 \cdot 10^{-2}$
3-CN	$0,86 \cdot 10^{-2}$	4-CONH ₂	$1,17 \cdot 10^{-2}$

к НАД. За исключением карбоксильной и аминотетильной групп, природа заместителя не влияла существенно на величину K_i . N-Бензилникотинамид хуже связывался с алкогольдегидрогеназой дрожжей, чем N-бензилникотиновая кислота: для последней K_i в 3—4 раза выше. Это, по-видимому, объясняется неблагоприятным взаимодействием дополнительного отрицательного заряда с ферментом [131]. Данные согласуются с отсутствием коферментной активности в случае никотиновая кислота — адениндинуклеотид в реакциях окисления этанола, катализируемых алкогольдегидрогеназой дрожжей [132].

Идея о неполярной природе участка связывания кофермента, высказанная как на основании данных о сдвиге максимума в спектре поглощения НАДН в область более коротких длин волн при взаимодействии с дегидрогеназами, так и результатов, полученных при изучении аналогов НАД, нашла подтверждение в основном в работах [133—137]. Было показано, что N-алкилпроизводные никотинамида ингибируют алкогольдегидрогеназу дрожжей и глицерофосфатдегидрогеназу конкурентно по отношению к НАД и что степень ингибирования возрастает с увеличением длины углеводородной цепи алкильного заместителя [135]. Наблюдалась линейная зависимость величины $1/K_i$ от числа

углеродных атомов в алкильном заместителе, начиная с $n=6$. Изменение свободной энергии на одну метильную группу составило 0,47 ккал/М (глицерофосфатдегидрогеназа) и 0,39 ккал/М (алкогольдегидрогеназа печени лошади). Интересно, что отсутствовала прямая пропорциональная зависимость для алкильных радикалов с небольшой длиной цепи — от CH_3 до C_5H_{11} включительно. Это отражает, по мнению Anderson, наличие «критического» расстояния между участками связывания пиридинового кольца и гидрофобной областью в активном центре алкогольдегидрогеназы дрожжей и глицерофосфатдегидрогеназы. Возможно также, что первоначальное увеличение длины алкильного заместителя препятствует реакции алкилирования.

При изучении ингибирования глицерофосфатдегидрогеназы соединениями, структурно подобными адениновой части молекулы кофермента, Kim, Anderson показали, что наименее эффективно связывается аденозин [135].

**Ингибирование
глицерофосфатдегидрогеназы производными
аденина [135]**

Соединение	K_i , М
Аденозин	$4,28 \cdot 10^{-3}$
АМФ	$2,01 \cdot 10^{-3}$
АДФ	$6,67 \cdot 10^{-4}$
АДФ-рибоза	$1,79 \cdot 10^{-4}$

Производные аденина ингибируют глицерофосфатдегидрогеназу конкурентно по отношению к НАД. Из приведенных данных следует, что чем большему фрагменту молекулы НАД соответствует соединение, тем более эффективно оно связывается в активном центре дегидрогеназы: константа ингибирования падает. Ингибирование возрастает в ряду аденозин < АМФ < АДФ, т. е. с увеличением числа отрицательно заряженных фосфатных остатков. Подобная зависимость наблюдается и для ряда

других дегидрогеназ. Это свидетельствует в пользу того, что в активном центре дегидрогеназ имеется катионный участок, взаимодействующий при связывании НАД с остатками фосфорной кислоты.

Этот вывод согласуется с данными Winer, Schwert, Milor, показавших, что аденин и аденозин не гасят флюоресценцию, характеризующую образование комплекса лактатдегидрогеназа-НАДН [52].

Константы ингибирования K_i для АДФ и АДФ-рибозы, ингибирующих алкогольдегидрогеназу дрожжей конкурентно по отношению к НАД, составили $8,45 \cdot 10^{-3}$ и $2,65 \cdot 10^{-3}$ М соответственно [134]. Из величин K_i было вычислено изменение свободной энергии при связывании ингибитора фер-

ментом. Оказалось, что сумма ΔF для N'-метилникотинамида и АДФ-рибозы (1,62 и 3,51 ккал/град · моль соответственно) больше, чем ΔF для связывания НАД.

АМФ, АДФ-рибоза и НАДН в сочетании с субстратами сильно тормозят обмен цинка в алкогольдегидрогеназе печени лошади, в то время как N-метилникотинамид, один или в присутствии субстрата, был совершенно неактивен [101]. Никотинамидная группа имеет важное значение для связывания алкогольдегидрогеназой: АДФ-рибоза связывается примерно в 50 раз слабее, чем НАДН [140].

Данные по рентгеноструктурному анализу лактатдегидрогеназы мышц акулы с разрешением в 4 Å свидетельствовали о том, что аденозин связывается вблизи несущественной SH-группы [141]. Для этого фермента известно существование 3 типов SH-групп: типа А, обладающих наивысшей реакционной способностью, типа В, существенных для катализа, но блокирующихся ртутьорганическими соединениями во вторую очередь, и типа С, несущественных и обладающих наименьшей нуклеофильностью. Субъединица лактатдегидрогеназы мышц акулы имеет нерегулярную форму и имеет две области, соединенные более узкой частью в непосредственной близости к существенному тиолу.

В работе, вышедшей в 1970 г. [142], содержатся доказательства того, что расстояние между гетероциклами молекулы НАД при связывании в активном центре лактатдегидрогеназы составляет 12 Å. Это соответствует развернутой конформации НАД и согласуется, таким образом, с предположением Velick, высказанным им на основании данных флуоресценции [38].

Расстояние между существенной SH-группой (участок В) и никотинамидным кольцом НАД равно 13,5 Å. Никотинамидное кольцо погружено наиболее глубоко в молекулу белка. Наименьшее расстояние между никотинамидными кольцами молекул кофермента в пределах тетрамера составляет 21 Å.

Важное значение аденинового кольца для связывания молекулы НАД было показано также в опытах по конкурентному ингибированию различными производными аденина [133, 134, 143, 144]. Связывание производных аденина и никотинамида происходит в различных участках поверхности фермента [132, 133]. В опытах по одновременному ингибированию двумя конкурентными ингибиторами оказалось, что все производные никотинамида связываются одновременно с производными аденина [135, 138]. Величины

α -константы взаимодействия двух конкурентных ингибиторов в активном центре дегидрогеназ, определенные по Theorell [145], показывают, что связывание N-метилникотинамида исключает связывание N-бензилникотинамида, константа α стремится к бесконечности. Это говорит о том, что ингибиторы связываются одним и тем же участком активного центра дегидрогеназы. Все производные никотинамида связываются одновременно с аденозином и аденозинфосфатами. Полученные данные, так же как и результаты исследований аналогов НАД, свидетельствуют в пользу наличия по крайней мере 2 областей в участке связывания НАД-никотинамидной и адениновой.

Известно, что существует конкурентная взаимосвязь между НАД и НАДН. Это соответствует известному различию молекул окисленной и восстановленной форм НАД. Ответ на вопрос о том, какие области связывания являются общими и какие различными для НАД и НАДН в реакции окисления этанола, катализируемой алкогольдегидрогеназой дрожжей, был получен при исследовании взаимодействия НАДН-АМФ и НАДН-N-пентилникотинамид (табл. 3).

Таблица 3

Взаимодействие производных никотинамида и аденина в активном центре алкогольдегидрогеназы. α -Константа взаимодействия конкурентных ингибиторов [135]

Соединение	N-бензилникотинамид	N-пентилникотинамид	АМФ
АМФ	1,00	0,54	—
АДФ	—	0,37	—
N-метилникотинамид	∞	—	—
НАДН	—	0,67	—

Для первой пары величина α стремится к ∞ , что свидетельствует в пользу исключения НАДН при связывании АМФ. В то же время N-алкилникотинамид и НАДН связываются одновременно. По-видимому, пиридиновый участок НАД-связывающей области не принимает участия в связывании НАДН, общим является адениновый участок.

Для объяснения связывания было высказано предположение о том, что в случае как НАД, так и НАДН аденозиндифосфатный фрагмент молекулы динуклеотида зани-

мает одно и то же положение на поверхности фермента [146]. Неизменным является и связывание карбоксамидной группы никотинамидного кольца. Различие в связывании НАД и НАДН должно в таком случае происходить за счет иного пространственного положения никотинамидного кольца. В ходе реакции восстановления происходит поворот плоскости кольца по β -гликозидной связи и по связи в положении 3, которое далее, при обратной реакции окисления, занимает первоначальное положение. Такая трактовка процесса связывания кофермента маловероятна, поскольку должна объяснить разницу в прочности связывания (K_m для НАДН примерно в 100 раз меньше, чем для НАД) только за счет никотинамидного кольца. Скорее следует предположить существенное различие во вкладе каждой из частей молекулы динуклеотида в случае окисленной и восстановительной форм.

Theorell высказал предположение о том, что связывание кофермента с алкогольдегидрогеназой печени лошади происходит в 2 стадии, на первой из которых с активным центром взаимодействует адениновая, а на второй — никотинамидная компонента [147]. Последующая работа по изучению связывания НАДН методом остановленной струи показала, что ни в одном случае при измерении скорости связывания не наблюдался lag-период [148]. Невозможно экспериментально различить одновременное и раздельное связывание обоих гетероциклических колец НАДН. Это удалось сделать Shore [149], использовавшему аналог НАД и показавшему, что скорость связывания дигидроникотинамидгипоксантидинуклеотида (НГДН) меньше, чем НАДН (константы скорости реакции $K=1,3$ и $6,9 \text{ мкМ}^{-1}\text{сек.}^{-1}$ соответственно), а скорость реакции диссоциации примерно одного порядка ($1,7 \text{ мк М}^{-1} \text{сек.}^{-1}$ для НАДН и $2,6 \text{ мкМ}^{-1}\text{сек.}^{-1}$ для НГДН). Опыты с дигидро-3-ацетилпиринадениндинуклеотидом показали, что замена карбоксамидной группы в НАДН на ацетильную не изменяет скорость ассоциации, но сильно уменьшает стабильность фермент-коферментного комплекса.

НАД-зависимые дегидрогеназы представляют собой олигомеры, состоящие из 4 или более субъединиц. Диссоциация олигомера приводит к утрате ферментативной активности, на основании чего было предположено, что активный центр формируется при ассоциации в месте контакта субъединиц таким образом, что часть функциональных групп активного центра принадлежит одной, а часть — другой,

субъединице [75]. Эта идея получила распространение и развитие. Для дегидрогеназы-тетрамера предполагается расположение субъединиц в вершинах тетраэдра [150, 151].

Числу субъединиц соответствует количество связанных молей кофермента. Для тетрамера-лактатдегидрогеназы эта величина найдена равной $3,6 \pm 0,4$ [152].

Скорость образования бинарных фермент-коферментных комплексов весьма велика. В случае присоединения трех эквивалентов НАД к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе реакция заканчивается в течение 3 мсек [153].

Величины констант скоростей образования фермент-коферментных комплексов алкогольдегидрогеназой печени лошади, приведенные в 1951 г. в работе [154], равны $4 \cdot 10^{-6} \text{М}^{-1} \text{сек.}^{-1}$ для НАДН и $2 \cdot 10^{-6} \text{М}^{-1} \text{сек.}^{-1}$ для НАД (рН 7,0). Скорость же распада комплекса фермент — кофермент существенно больше в случае НАД по сравнению с НАДН.

Определение величины K_M в реакциях, катализируемых алкогольдегидрогеназой дрожжей, показало, что сродство фермента к НАДН больше, чем к НАД. Наличие конкуренции между НАД и НАДН свидетельствует о том, что участок связывания этих форм один и тот же [155, 156].

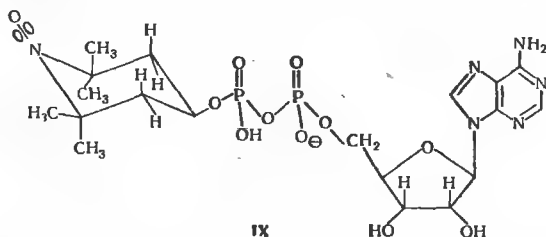
Константы диссоциации комплексов НАД-и НАДН-фермент изменяются в противоположном направлении с изменением рН [157, 158]. Для НАД величина константы падает, а для НАДН — возрастает при увеличении рН.

О существенном различии прямой и обратной реакций, катализируемых лактатдегидрогеназой, свидетельствуют данные зависимости скорости реакции от рН [92, 159]. В случае НАД это колоколообразная кривая с максимумом в области рН 10,0, в случае окисления НАДН — реакция прогрессивно ускоряется при понижении рН и кривая имеет S-образный вид.

В течение последних нескольких лет наблюдается все более интенсивное использование стабильных радикалов (спин-меток) в качестве репортерских групп при исследовании механизма ферментативных реакций. В 1969 г. был синтезирован спин-меченный аналог НАД — аденозин-5'-пирофосфат-4-(2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксил) (IX) и было изучено его взаимодействие с алкогольдегидрогеназой [160—162].

В соединении IX связь N—O в пиперидиноксиле, по которой делокализован неспаренный электрон, пространственно занимает положение β-гликозидной связи в молекуле НАД.

Как и следовало ожидать, этот аналог оказался сильным НАД-конкурентным ингибитором с константой ингибирования $K_i = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$ в реакциях, катализируемых алкогольдегидрогеназой печени лошади, и $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ в реакциях, катализируемых алкогольдегидрогеназой дрожжей, что дало возможность использовать его в качестве метки при обратимом связывании с активным центром этих ферментов.



Оказалось, что при связывании аналога ЭПР-сигнал заметно уширяется, а скорость продольной релаксации воды возрастает. В алкогольдегидрогеназе печени лошади титровались с помощью аналога 2-го участка на поверхности фермента с константой диссоциации комплекса $K_d = 17 \pm 8 \text{ мкМ}$ и 5—6 участков с $K_d = 9 \text{ мкМ}$. Константа диссоциации НАДН из комплекса с ферментом, определенная при титровании, составила $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$, что значительно превышает величину, найденную ранее методом флюориметрического титрования — $2,0 \cdot 10^{-7} \text{M}$ [165].

Обсуждение вопросов, связанных с поведением кофермента в активном центре дегидрогеназ, целесообразно закончить рассмотрением одного из конкретных механизмов действия, предложенных в последнее время.

Еванс и Rabin [88] предложили следующий механизм превращения субстрата и кофермента в активном центре алкогольдегидрогеназы (рис. 7). В реакции окисления этанола вначале образуется бинарный комплекс фермент—кофермент (Е-НАДН), причем важную роль на этой стадии играет взаимодействие АДФ-компоненты с ферментом [163]. Отчасти такое взаимодействие состоит в протонировании аденинового кольца. Затем присоединяется субстрат в виде алкоксид-иона и образуется тройной комплекс Е-НАД-спирт. Алкоксид-ион стабилизируется путем взаимодействия с атомом цинка в гидрофобном окружении. Предполагается, что активация пиридинового кольца включает образование комплекса Е-НАД-спирт. Этот активированный комплекс существует, вероятно, в очень незначитель-

ной концентрации и не может быть обнаружен спектрофотометрически. Перенос гидрид-иона можно представить как несколько видоизмененную реакцию Мейервейна-Пондорфа, в которой цинк участвует в циклическом потоке электронов. Активированный комплекс АДГ-НАДН-спирт затем дезактивируется путем удаления Н-группы с последующей диссоциацией продуктов реакции. Наиболее трудной стадией в химической реакции подобного типа является разрыв связи С—Н освобождением гидрид-иона. Механизм, предложенный Evans и Rabin, объясняет легкость реакции на этой стадии в обоих направлениях. Для НАДН в обратной реакции присоединение серы приводит к возникновению дополнительного механизма освобождения электронов из атома кислорода амидной группы.

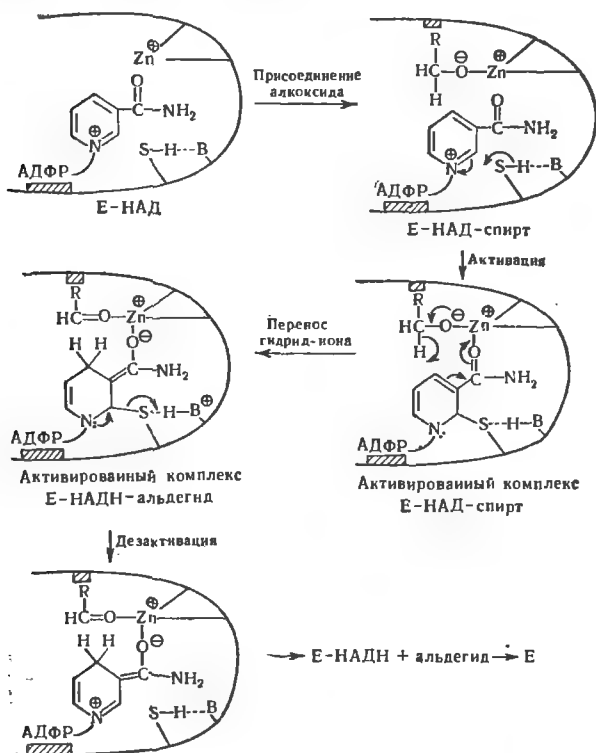


Рис. 7. Механизм превращения субстрата и кофермента в активном центре алкогольдегидрогеназы [88].

Весьма вероятно, что реакция переноса водорода происходит в гидрофобной области белка. Об этом свидетельствуют данные конкурентного ингибирования алкилзамещенными пиридинами, алкиламмониевыми солями и некоторыми ароматическими соединениями — бензолом, толуолом, индолом, нафталином. По данным рентгеноструктурного анализа, атом цинка расположен на значительном удалении от коферментсвязывающего участка алкогольдегидрогеназы [164], что делает мало вероятным его непосредственное участие в переносе электронов. Так же как и существенные SH-группы, атом цинка выполняет, по-видимому, структурную роль.

ЛИТЕРАТУРА

1. Браунштейн А. Е. В кн.: Химия и биология пиридоксалевого катализа. М., 1968, с. 186.
2. Shifrin S., Kaplan N. O. В кн.: Advans. Enzymol., 1960, 22, 337.
3. Kaplan N. O. В кн.: Enzymes. New York, 1960, 3, 127.
4. Moore C. E., Underwood A. L. Anal. Biochem., 1969, 29, 149.
5. Chaykin S., Meissner L. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1964, 14, 233.
6. Jarmolinsky M. B., Colowick S. P. Biochim. Biophys. Acta, 1956, 20, 177.
7. Ludowieg M. B., Bhacca N., Levy A. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1964, 14, 431.
8. Красновский А. А., Брин Г. П. ДАН СССР, 1968, 153, 212.
9. Ludowieg J., Levy A. Biochemistry, 1964, 3, 373.
10. Ditmar A., Fondy L. J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 91.
11. Wallenfels' K. В кн.: The steric course of microbiological reactions. L., 1959, p. 10.
12. Голованов И. Б., Пискунов А. К., Сергеев Н. М. В кн.: Элементарное введение в квантовую биохимию. М., 1969, с. 225.
13. Gutman M., Margalit R., Schyter A. Biochemistry, 1968, 7, 2778.
14. Amelunxen D., Grisolia S. J. Biol. Chem., 1962, 237, 3240.
15. Tucker D., Grisolia S. J. Biol. Chem., 1962, 237, 1068.
16. Arancyo M., Cilento G. Biochemistry, 1969, 8, 2140.
17. Bates D. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1970, 39, 502.
18. Lamborg M., Burton R., Kaplan N. J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 6173.
19. Woenckhaus C., Jeck R. Lieb. Ann., 1970, 736, 126.
20. Colowick S., Kaplan N., Ciotti M. J. Biol. Chem., 1951, 191, 447.
21. Colowick S., Kaplan N. Там же, 1961, 236, 2716.
22. Meyerhof O., Ohlmeyer P., Mohle W. Biochem. Z., 1938, 297, 113.
23. Pfeleiderer G., Jeckel D., Wieland T. Biochem. Z., 1956, 328, 187.
24. Pfeleiderer G., Jeckel D., Wieland T. Biochem. Z., 1957, 329, 104.
25. Walter P., Kaplan N. J. Biol. Chem., 1963, 238, 2823.
26. Anderson B., Kaplan N. J. Biol. Chem., 1959, 234, 1226.
27. Miles D., Kaplan N. Lieb. Ann., 1959, 621, 166.
28. Ozols R., Marinetti G. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1969, 34, 712.

29. *San Pietro A., Kaplan N., Colowick S. J.* Biol. Chem., 1955, **212**, 941.
30. *Bergmeyer N., Bernt E., Hess B.* В кн.: Methods of enzymatic analysis. Ed. Bergmeyer, N. Y., 1965, p. 736.
31. *Johnson S., Rumon K.* Biochemistry, 1970, **9**, 4, 854.
32. *Windmueller H., Kaplan N. J.* Biol. Chem., 1961, **236**, 2716.
33. *Weber G.* Nature, 1957, **180**, 1409.
34. *Freed S., Neufach E., Tumerman L.* Biochim. Biophys. Acta, 1967, **143**, 432.
35. *Sarma P., Kaplan N., Ross V.* Biochemistry, 1968, **7**, 3052.
36. *Sarma P., Kaplan N. J.* Biol. Chem., 1969, **244**, 771.
37. *Patel D.* Nature, 1969, **221**, 1239.
38. *Velick S. J.* Biol. Chem., 1958, **233**, 1455.
39. *Karle R.* Acta Cryst., 1961, **14**, 497.
40. *Pullman M., San Pietro A., Colowick S.* Biol. Chem., 1954, **206**, 129.
41. *Maggiora G., Johansen H., Igram L.* Arch. Biochem. Biophys., 1969, **131**, 352.
42. *Cilento G., Filho E., Albonese A. J.* Am. Chem. Soc., 1958, **80**, 4472.
43. *Kosower E.* Biochim. Biophys. Acta, 1962, **56**, 474.
44. *Hutton R., Westheimer F.* Tetrahedron, 1958, **3**, 73.
45. *Sarma P., Kaplan N.* Biochemistry, 1970, **9**, 557.
46. *Chan R., Ingold C., Prelog V.* Angew. Chem. Intern. Ed. Engl., 1966, **5**, 385.
47. *Sarma P., Kaplan N.* Biochemistry, 1970, **9**, 539.
48. *Catterall W., Hollis D., Walter C.* Biochemistry, 1969, **8**, 4032.
49. *Shifrin S., Kaplan N.* Nature, 1959, **183**, 1529.
50. *Sarma R., Moore M., Kaplan N.* Biochemistry, 1970, **9**, 549.
51. *Miles D., Urry D. J.* Biol. Chem., 1968, **243**, 4181.
52. *Winer A., Schwert G., Milor D. J.* Biol. Chem., 1959, **234**, 1149.
53. *Winer A., Schwert G. J.* Biol. Chem., 1959, **234**, 1155.
54. *Schwert G. J.* Am. Chem. Soc., 1957, **79**, 6571.
55. *Whitehead E., Rabin B.* Biochem. J., 1964, **90**, 532.
56. *Jardetzky O., Wade-Jardetzky N. J.* Biol. Chem., 1966, **241**, 85.
57. *Kosower E. B.* В кн.: Enzymes. V. **3**, 1960, **4**, 171.
58. *Shifrin S. B.* В кн.: Molecular associations in biology, 1968, **4**, 323.
59. *Shifrin S.* Biochim. Biophys. Acta, 1964, **81**, 205.
60. *Szent Györgyi A., Isenberg I., McLanghlin J.* Proc. Natl. Acad. Sci. US, 1961, **47**, 1089.
61. *White W. J.* Am. Chem. Soc., 1959, **81**, 2912.
62. *Cilento G., Schreier S.* Arch. Biochem. Biophys., 1964, **107**, 102.
63. *Anderson B., Reynolds M.* Arch. Biochem. Biophys., 1966, **114**, 299.
64. *Pullman B., Pullman A.* Proc. Natl. Acad. Sci. US., 1958, **44**, 1197.
65. *Haustein W., Hatefi Y.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 1957, **34**, 613.
66. *Kaplan N., White S.* Ann. N.Y. Acad. Sci., 1963, **103**, 835.
67. *Eisele B., Wallenfels K.* FEBS Letters, 1968, **1**, 25.
68. *Boross L., Cseke E.* Acta Biochem. Biophys., 1967, **2**, 39.
69. *Vijlder De J., Slater E.* Biochim. Biophys. Acta, 1968, **167**, 23.
70. *Conway A., Roshland D.* Biochemistry, 1968, **7**, 4011.
71. *Trentham D.* Biochem. J., 1968, **109**, 603.
72. *Malhotra O., Bernhard S. J.* Biol. Chem., 1968, **243**, 1243.
73. *MacQuarrie S., Bernhard S.* Preprint. London, 1969.

74. Eys van J., Kretschmar R., Tseng N., Cunningham L. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1962, 8, 243.
75. Holbrook T., Pfeleiderer G. Biochem. Z., 1966, 344, 141.
76. Pfeleiderer G., Jeckel D. Europ. J. Biochem., 1969, 2, 171.
77. Móra S., Elödi P. 5-th Meeting FEBS. Praha, 1968, abstr. 788.
78. Südi J., Khan M. FEBS Letters, 1970, 6, 253.
79. Heitz J., Anderson B. Arch. Biochem. Biophys., 1968, 127, 637.
80. Holbrook T., Jeckel D. Biochem. J., 1969, 111, 689.
81. Holbrook T., Jeckel D. Arch. Biochem. Biophys., 1967, 122, 519.
82. Gold A., Segal H. Biochemistry, 1965, 4, 1506.
83. Woenckhaus C., Berghäuser J., Pfeleiderer G. Hoppe-Seyl Z. Physiol. Chem., 1969, 350, 473.
84. Leven M., Pfeleiderer G., Berghäuser J., Woenckhaus C. Hoppe-Seyl Z. Physiol. Chem., 1969, 350, 1647.
85. Leskovac V., Pfeleiderer G. Hoppe-Seyl Z. Physiol. Chem., 1969, 350, 484.
86. Tipton K. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 151, 692.
87. Drum D., Harrison J., Li T., Bethume J., Vallee B. P.N.A.S., 1967, 57, 1434.
88. Evanc N., Rabin B. Europ. J. Biochem., 1968, 4, 548.
89. Dugańczyk A., Malecki M., Eiler J. J. Biol. Chem., 1968, 243, 2236.
90. Domagk G., Domschke W., Hinüber C. Hoppe-Seyl Z. Physiol. Chem., 1970, 351, 718.
91. Domschke W., Hinüber C., Domack G. Biochim. Biophys. Acta, 1970, 207, 485.
92. Winer A., Schwert G. J. Biol. Chem., 1958, 231, 1065.
93. Fischer H., Conn E., Westheimer F. J. Biol. Chem., 1952, 202, 687.
94. Loewus F., Ofner P., Fischer H., Westheimer F. J. Biol. Chem., 1952, 202, 699.
95. Schellenberg K. J. Biol. Chem., 1966, 241, 2446.
96. Schellenberg K. J. Biol. Chem., 1967, 242, 1815.
97. Schellenberg K. J. Am. Chem. Soc., 1966, 88, 1077.
98. Colowick S., Compra R. Biochemistry, 1966, 14, 361.
99. Wong J., Williams G. Arch. Biochim. Biophys., 1968, 124, 344.
100. Kaplan N., Colowick S., Neufeld E. J. Biol. Chem., 1952, 195, 107.
101. Cilento G., Ginsti P. J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 3801.
102. Alivisatos S., Mourkides G., Jibril A. Nature, 1960, 186, 718.
103. Kosower E. Biochim. Biophys. Acta, 1962, 56, 474.
104. Boyer P., Theorel H. Acta Chem. Scand., 1956, 10, 447.
105. Harris J., Meriwether B., Park J. Nature, 1963, 198, 154.
106. Polgar L. Biochim. Biophys. Acta, 1966, 118, 276.
107. Chance B., Park J. J. Biol. Chem., 1967, 242, 5093.
108. Ronchi S., Zapponi M., Ferri G. Europ. J. Biochem., 1969, 8, 325.
109. Harris J., Polgar L. J. Mol. Biol., 1965, 14, 630.
110. Park J., Angello C., Matthew E. J. Biol. Chem., 1967, 241, 769.
111. Ronchi S., Zapponi M., Ferri G. Europ. J. Biochem., 1969, 8, 325.
112. Dowschke W., Domagk G. Z. Physiol. Chem., 1969, 350, 111.
113. Pfeleiderer G., Jeckel D., Wieland T. Biochem. Z., 1958, 320, 296.
114. Pfeleiderer G. 5-th Meeting FEBS, Praha, 1968, Abst. 871.
115. Anderson S. Biochemistry, 1969, 8, 1394.
116. Hammond P. J. Phys. Chem., 1970, 74, 647.
117. Woenckhaus C., Volz M., Pfeleiderer G. Z. Naturforsch., 1964, 196, 467.
118. Hongo H., Furukawa J., Morijama K., Tanaka N. Chem. Pharm. Bull., 1963, 11, 712.

119. *Fawcett C., Kaplan N. J. Biol. Chem., 1962, 237, 1709.*
120. *Windmueller H., Kaplan N. J. Biol. Chem., 1961, 236, 2717.*
121. *Lamborg M., Stolzenbach F., Kaplan N. J. Biol. Chem., 1958, 231, 685.*
122. *Kaplan N., Krotti M., Stolzenbach F. J. Biol. Chem., 1956, 221, 833.*
123. *Pullman M., Colowick S., Kaplan N. J. Biol. Chem., 1952, 194, 593.*
124. *Eys van J., Ciotti M., Kaplan N. J. Biol. Chem., 1958, 231, 571.*
125. *Eys van J., Kaplan N. Biochim. Biophys. Acta, 1957, 23, 574.*
126. *Woenckhaus C., Zumpe P. Z. Naturforschung., 1968, 236, 484.*
127. *Woenckhaus C., Ingold C., Prelog V. Angew. Chem. Intern. Ed. Engl., 1966, 5, 385.*
128. *Pfleiderer G., Woenckhaus C. Lieb. Ann., 1964, 675, 205.*
129. *Pfleiderer G., Sann E., Orandel F. Biochim. Biophys. Acta, 1963, 73, 39.*
130. *Eys van J., Kaplan N. Biochim. Biophys. Acta, 1957, 23, 574.*
131. *Heitz J., Anderson B. Mol. Pharmacol., 1968, 4, 44.*
132. *Lamborg M., Stolzenbach F., Kaplan N. J. Biol. Chem., 1958, 231, 685.*
133. *Anderson B., Reynolds M. Arch. Biochem. Biophys., 1965, 111, 1.*
134. *Anderson B., Reynolds M. Arch. Biochem. Biophys., 1965, 111, 202.*
135. *Kim S., Anderson B. J. Biol. Chem., 1968, 243, 3351.*
136. *Anderson B., Anderson C. Biochim. Biophys. Res. Comm., 1964, 16, 258.*
137. *Anderson B., Reynolds B. Biochim. Biophys. Acta, 1965, 96, 45.*
138. *Heitz J., Anderson C., Anderson B. Arch. Biochem. Biophys., 1968, 127, 1627.*
139. *Plapp B., Woenckhaus C., Pfeleiderer G. Arch. Biochem. Biophys., 1968, 128, 360.*
140. *Yonetani T., Theokell H. Arch. Biochim. Biophys., 1963, 100, 554.*
141. *Adams M., Haas D., Jeffery B., McPherson A., Mermall H., Rosman M., Schevitz R., Wonacott A. J. Mol. Biol., 1969, 41, 159.*
142. *Agam N., Mepherson A., Rossmann M., Schevitz R., Woratott A. J. Mol. Biol., 1970, 51, 31.*
143. *Wallenfels K., Sund H., Diekmann N. Biochem. Z., 1957, 329, 48.*
144. *Hoch M., Martin C., Wacker B., Vallee B. Arch. Biochem. Biophys., 1960, 91, 166.*
145. *Yonetani T., Theorell H. Arch. Biochim. Biophys., 1964, 106, 243.*
146. *Грин Д., Гольдбергер Р. В кн.: Молекулярные аспекты жизни. М., 1968, 121.*
147. *Theorell H., Ehrenbarg A., Zalinski C. Biochim. Biophys. Res. Comm., 1967, 27, 309.*
148. *Geraci G., Gibson Q. J. Biol. Chem., 1967, 242, 4275.*
149. *Shore J. Biochemistry, 1969, 8, 1588.*
150. *Курганов Б. И., Сугробова Н. П. Биофизика, 1967, 12, 193.*
151. *Rossmann M., Jeffery B., Main P., Warren S. Proc. Natl. Acad. Sci. US, 1967, 57, 515.*
152. *Takenaka H., Schwert G. J. Biol. Chem., 1956, 223, 157.*
153. *Vijlder De J., Slater E. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 167, 23.*
154. *Theorell H., Chance B. Acta Chem. Scand., 1951, 5, 1127.*
155. *Velick S. В кн.: Mechanism of enzyme action. Baltimore, 1954.*
156. *Hayes J., Velick S. J. Biol. Chem., 1954, 207, 225.*
157. *Theorell H., Bonnichsen N. Acta Chem. Scand., 1951, 5, 1105.*

158. *Theorell H.* Harvey Lectures., Ser., 1967, **61**, p. 17.
159. *Jecsain G.* Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 1961, **20**, 339.
160. *Weiner H.* Biochemistry, 1969, **8**, 526.
161. *Mildvan A., Weiner H.* Biochemistry, 1969, **8**, 552.
162. *Mildvan A. J.* Biol. Chem., 1969, **244**, 2465.
163. *Shore J., Theorell H.* Europ. J. Biochem., 1967, **2**, 32.
164. *Birändin C.* Цит. по Sund H. FEBS Letters, 1970, **8**, 309.
165. *Yonetani T.* Acta Chem. Scand., 1963, **17**, 96.
166. *Schaeffer H., Odin E. J.* Med. Chem., 1966, **9**, 576.
167. *Ronca G., Ronca-Testoni S.* Biochim. Biophys. Acta, 1969, **178**, 577.
168. *Velick S.* В кн.: Light and Life, Ed. McElroy W., Glass B., 1961, p. 108.
169. *Scott T., Spencer R., Leonard N., Weber G. J.* Am. Chem. Soc., 1970, **92**, 687.
170. *Siegel J., Montgomery G., Bock R.* Arch. Biochem. Biophys., 1959, **82**, 288.
171. *Jacobus J.* Biochemistry, 1971, **10**, 161.
172. *Oppenheimer N., Arnold L., Kaplan N.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, **68**, 3200.
173. *Sarma R., Kaplan N.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 1969, **36**, 780.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ НАД-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ

П. ЭЛОДИ

*Институт биохимии Венгерской академии наук,
Будапешт*

Сравнительные биохимические исследования показали, что соединения с небольшим молекулярным весом, такие, как коферменты, простетические группы и т. д., распространены во всех живых организмах, а эволюционные изменения в их структуре либо незначительны, либо отсутствуют. Это значит, что химическая структура отдельных соединений, играющих главную роль в процессах метаболизма живых организмов, например НАД, АТФ, ФАД, гема, пиридоксальм и др., сохранилась с момента возникновения жизни на Земле. В то время как белки, функционирующие в виде комплексов с этими веществами, по-видимому, изменяются, их низкомолекулярные партнеры остаются неизменными.

При изучении гомологов белков, имеющих сходную биологическую функцию, но различное происхождение, бывает трудно решить, что более значительно — их сходство или различие. Биохимики, изучающие эволюцию и пользующиеся созданными филогенетическими схемами на основе аминокислотных замещений в гомологичных белках, очевидно,

ищут различий в последовательности аминокислот. С другой стороны, биохимики, обращая внимание на постоянство метаболических процессов, могут быть легко приведены в замешательство в тех случаях, когда сходство в функциональных свойствах должно объясняться на основании первичной, в значительной степени непостоянной структуры.

Для того чтобы избежать неясности, не следует забывать, что как сходства, так и различия имеют свое собственное значение, если их рассматривать в правильной взаимосвязи.

На основании вышесказанного можно обсудить характерные свойства НАД-зависимых дегидрогеназ. Способность взаимодействовать с НАД является общим свойством этих ферментов. Из этого следует, что у них должны быть аналогичные или сходные по структуре участки, связывающие кофермент, а участки, связывающие различные субстраты, должны быть, следовательно, различны.

Эти ферменты представляют собой яркий пример существования глубокой связи между структурой и функцией. Тем не менее их молекулярный вес может быть различным (табл. 4). Размер полипептидных цепей (субъединиц) колеблется в одних и тех же пределах, их молекулярный вес составляет около 36 000. До настоящего времени не обнаружено ферментной активности у отдельных субъединиц какой-либо из НАД-зависимых дегидрогеназ. За счет каких-то сил субъединицы организуются в структуру высшего порядка — четвертичную структуру, с возникновением которой проявляется биологическая активность этих ферментов.

НАД-зависимые дегидрогеназы, подобно большинству внутриклеточных ферментов, не содержат какие-либо вто-

Т а б л и ц а 4

Молекулярный вес НАД-дегидрогеназ

Дегидрогеназа	Молекулярный вес	Число субъединиц
Алкогольдегидрогеназа	68 000	2
Дегидрогеназа яблочной кислоты (сердце крупного рогатого скота)	67 000	2
Дегидрогеназа молочной кислоты	72 000	2
Дегидрогеназа молочной кислоты	145 000	4
Глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназа	145 000	4
Алкогольдегидрогеназа (дрожжи)	140 000	4
Глютаматдегидрогеназа	1 000 000	30

ричные ковалентные стабилизирующие связи, например такие, как дисульфидные мостики. Однако все они содержат сульфгидрильные группы, которые каким-то образом участвуют в каталитическом процессе, так как их блокирование обычно приводит к падению ферментативной активности. Непосредственное участие сульфгидрильных групп в катализе было убедительно доказано лишь в нескольких случаях. Данные, полученные в последние годы с различными дегидрогеназами, весьма многочисленны, поэтому здесь будут рассмотрены лишь две дегидрогеназы, которые в течение ряда лет изучались в нашей лаборатории: *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) и лактатдегидрогеназа (ЛДГ), выделенные из скелетных мышц свиньи [1, 2]. Особый интерес из этих дегидрогеназ представляет ГАФД, потому что Harris и др. [4, 5] недавно опубликовали ее аминокислотную последовательность (ферменты, выделенные из рака и свиньи). Более того, это первый фермент, в котором показано непосредственное участие сульфгидрильных групп в каталитической функции. В 1963 г. была установлена аминокислотная последовательность в области существенной сульфгидрильной группы [5]. Эта сульфгидрильная группа, находящаяся в положении 149 аминокислотной последовательности, отличается во многих отношениях от «обычной» группы. Она является единственной группой, которая может связывать ацилпроизводные, образуя стабильное соединение, ацил-фермент, и может алкилироваться различными соединениями, такими, как йодоацетат и т. д. Истинное значение pK этой группы очень мало [6]. Весьма вероятно, она участвует в образовании комплекса с переносом заряда с азотом никотинамидного цикла НАД в качестве донора электронов [7]. Другая сульфгидрильная группа в положении 152 очень близка к остатку 149, но, по-видимому, не обладает ни одним из этих свойств. Высокая избирательная химическая реактивность существенной сульфгидрильной группы может быть понижена за счет особого химического окружения. Например, имеется веское химическое подтверждение того, что «активный» цистеин-149 пространственно близок к лизину-183 в третичной структуре активной молекулы. Это утверждение основано на данных, свидетельствующих о наличии реакции $S \rightarrow N$ ацильной миграции между двумя остатками в процессе каталитического гидролиза *p*-нитрофенилацетата и ацетилфосфата [8, 9]. Остается, однако, неясным, происходит ли миграция ацильной группы в пределах

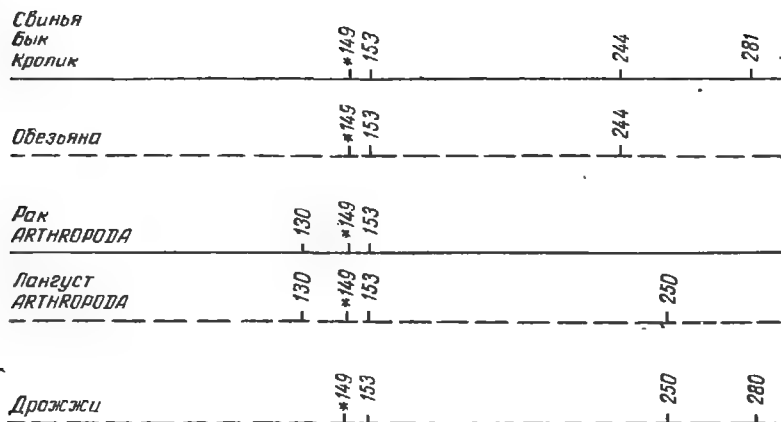


Рис. 8. Расположение остатков цистеина в полипептидной цепи ГАФД различного происхождения [3, 4].

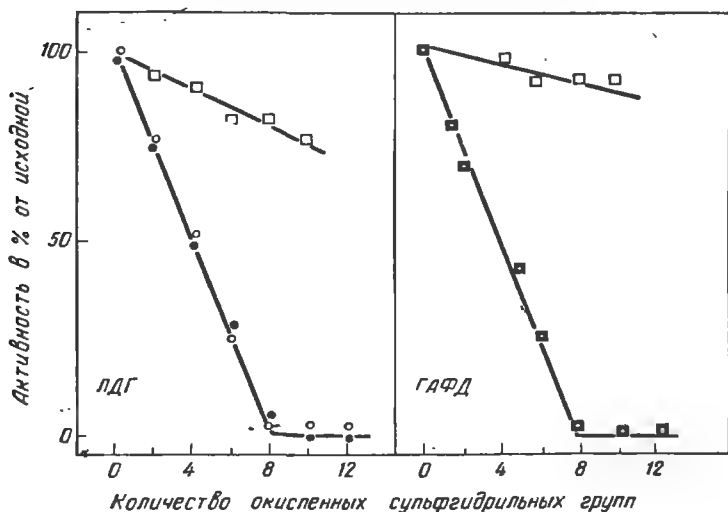


Рис. 9. Зависимость активности лактатдегидрогеназы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы от количества сульфгидрильных групп, окисленных йодом [11]. Светлыми и темными кружками отмечено снижение активности в реакциях окисления лактата и восстановления пирувата, соответственно; темным квадратом — снижение активности ГАФД, светлым квадратом — реактивация окисленных ферментов путем инкубирования в растворе 0,1 М меркаптоэтанола в течение 2 часов [11].

одной субъединицы, т. е. построен ли активный центр фермента из частей только одной или нескольких полипептидных цепей.

Распределение сульфгидрильных групп вне активного центра не обнаруживает какой-либо закономерности (рис. 8, 9). Например, фермент дрожжей содержит только две сульфгидрильные группы. В ферментах *Arthropoda* (рак и лангуст) было обнаружено пять сульфгидрильных групп на 1 субъединицу [3]. Park и др. представили недавно данные о S—S ацильной миграции между цистеином-149 и цистеином-281 [10]. Однако это нельзя рассматривать как общее свойство ГАФД, потому что в ферментных препаратах, выделенных из дрожжей или скелетных мышц обезьян, цистеин-281 отсутствует [21].

Доктор Мого исследовала пространственное распределение сульфгидрильных групп и ГАФД и ЛДГ с помощью окисления йодом и получила интересные результаты [11]. Во-первых, окисление 2 сульфгидрильных групп на 1 субъединицу приводило к инаktivации обоих ферментов (рис. 9). По-видимому, окисление происходит с участием «активной» сульфгидрильной группы и другой сульфгидрильной группы, расположенной в непосредственной близости от нее.

Образования дисульфидных связей между соседними

Таблица 5

Внутренняя вязкость и молекулярный вес необработанной и окисленной ГАФД и ЛДГ в 6 М растворе гуанидин гидрохлорида

Экспериментальные условия	мл/г	Молекулярный вес	мл/г	Молекулярный вес
Необработанный контроль в присутствии 0,1 М β-меркаптоэтанола	0,315±0,01	33 700±1 600	0,330±0,01	37 000±1 700
Обработанный йодом	0,345 ^[22]	36 300±1 500	—	35 000±2 000 ^[23]
Все сульфгидрильные группы окислены	0,325±0,01	35 300±1 600	0,57±0,1	85 000±22 000
Окислено две сульфгидрильные группы на субъединицу	—	—	0,325±0,01	36 200±1 700

субъединицами, вероятно, не происходит, так как окисленный фермент легко и полностью диссоциирует в концентрированных растворах гуанидин гидрохлорида (табл. 5).

В отличие от ГАФД молекулярный вес ЛДГ, окисленной в гуанидин гидрохлориде, был выше, чем молекулярный вес 1 субъединицы, что указывало на образование межцепочечной дисульфидной связи.

Можно предположить, что дисульфидная связь в ГАФД образуется между цистеином-149 и цистеином-153. К аналогичному выводу пришел Haggis [12], используя в качестве окислителя о-йодозобензоат. Если это действительно так,

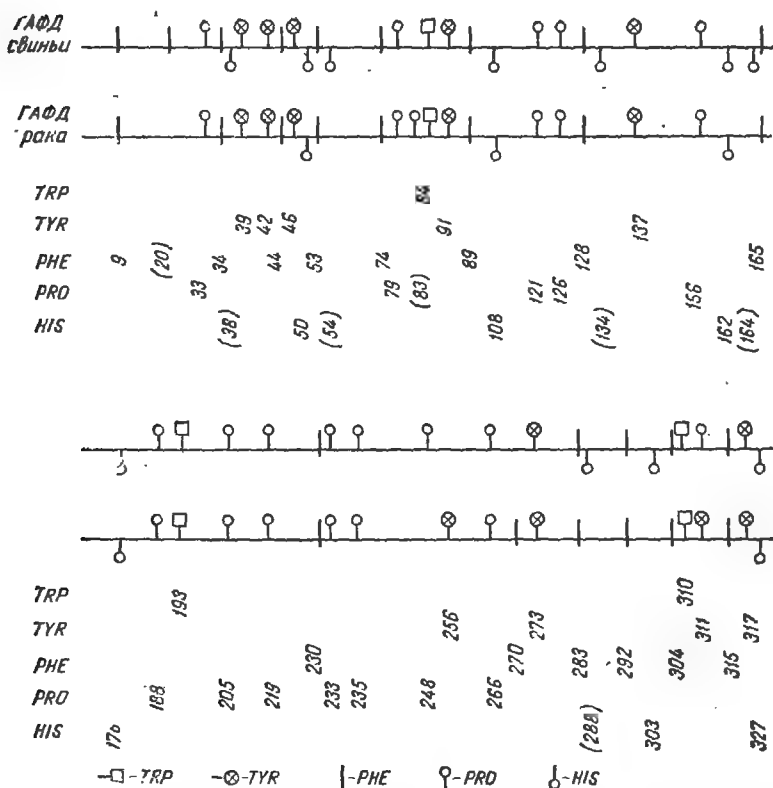


Рис. 10. Схематическое изображение распределения ароматических аминокислот в ГАФД свиньи и рака согласно данным Haggis с соавторами [3, 4].

то цистеин-244 и цистеин-281 должны образовывать вторую дисульфидную связь. Принимая во внимание, что окисление йодом не оказывает заметного влияния на конформацию ГАФД и что окисление полностью обратимо после добавления тиольных соединений, можно легко предположить, что цистеин-244 и цистеин-281 пространственно близки в третичной структуре нативного фермента.

Если искать сходство в аминокислотной последовательности ГАФД различного происхождения (рис. 10), то наиболее яркой гомологией, которая привлекает внимание, является почти идентичное положение ароматических аминокислот в полипептидной цепи. ГАФД как свиньи, так и рака содержит три триптофана на одну субъединицу и все они расположены в тех же самых положениях [3, 4]. Далее, все девять остатков тирозина и тринадцать из четырнадцати остатков фенилаланина, так же как и одиннадцать из двенадцати остатков пролина, можно найти в тех же самых положениях аминокислотной последовательности. Однако положение остатков гистидина радикально изменилось. Все 5 остатков гистидина ГАФД рака находятся в том же самом положении, что и 5 остатков гистидина фермента свиньи, однако последний содержит еще 6 остатков гистидина. Впрочем сходство в распределении ароматических аминокислот не является неожиданным, если мы примем во внимание, что 241 остаток аминокислот, т. е. 72% общего количества, расположен в идентичных положениях в обоих ферментах. Высокий уровень консерватизма в аминокислотной последовательности, которая фактически сохранилась неизменной на $\frac{3}{4}$ в течение 0,5 млрд. лет, оказывается весьма неожиданным, хотя аналогичное явление уже наблюдал Smith [13] в случае цитохромов С различного происхождения. Возникает вопрос, чем можно объяснить высокую степень гомологии в распределении ароматических аминокислот. Пока нет прямого указания на роль этих групп в осуществлении ферментом его функций. В литературе имеются данные, которые подтверждают образование комплекса с переносом заряда между азотом никотинамидного цикла НАД и одним из 3 остатков триптофана, хотя существование этого взаимодействия еще нуждается в дополнительном подтверждении [7].

На основании наблюдаемой гомологии в аминокислотной последовательности представляется целесообразным допустить, что ГАФД из физиологически далеких источников (по аналогии также и из других источников) могут

иметь общую трехмерную структуру. Количество данных об этой структуре невелико.

Объяснение неизменности положения ароматических аминокислот может быть связано с определенными закономерностями трехмерной структуры. Поэтому мы попытались получить некоторые данные о расположении ароматических аминокислот в пространственной структуре.

Конечно, является недостатком то, что имеющимся методами могут быть изучены только боковые цепи у 3 ароматических кислот — тирозина, триптофана и гистидина; фенилаланином и пролином приходится в данном случае пренебречь.

Ограниченная роль гистидиновых остатков в сохранении биологически активной конформации следует не только из непостоянства в последовательности, но также из неравномерного распределения их в трехмерной структуре. Это можно легко показать при изучении специфической реакции остатков гистидина с диэтилпирокарбонатом [14]. Это соединение специфически реагирует с остатками гистидина при pH 6,0, образуя карбэтоксипроизводное гистидина, которое проявляет характерную разницу поглощения при максимуме 240 нм [14].

В большинстве изученных дегидрогеназ значительное количество остатков гистидина недоступно действию диэтилпирокарбоната (табл. 6).

Таблица 6

Взаимодействие остатков гистидина с диэтилпирокарбонатом (ДПК) в дегидрогеназах [14, 15]

Фермент	Количество остатков гистидина на 140 000 белка		
	нативный фермент	фермент, обработанный ДПК	фермент, обработанный ДПК в присутствии додецилсульфата натрия
ГАФД:			
свиньи	44	20,9	41
кролика	44	21,0	43,0
рака	—	5,5	25,3
дрожжей	27	20,7	25,5
ЛДГ:			
скелетных мышц свиньи	42	44,0	44,0
сердца быка	33	17,4	36,0

Как относительное, так и абсолютное число «нереактивных» остатков гистидина в одной дегидрогеназе отличается от другой, свидетельствуя о менее резко выраженном структурном значении этих остатков. Полное карбоксилирование может быть осуществлено лишь в присутствии детергента или мочевины [15]. Неизвестно, является ли избирательная реактивность этих боковых цепей действительно следствием пространственных факторов или образования каких-то вторичных связей (что фактически также связано с требованиями определенного пространственного расположения).

Данные, полученные с помощью оптических методов (спектрофотометрическое титрование и денатурационные дифференциальные спектры), ясно показали, что значительное количество остатков тирозина и триптофана находится в гидрофобной внутренней части молекулы [16]. Для определения числа остатков тирозина и триптофана, находящихся в полярной и неполярной частях молекулы, доктор Мора [17] применила методику анализа изменений спектра белка под действием растворителя, введенную Herskovits, Laskowski [18]. Как видно из табл. 7, в ГАФД одинаковое

Таблица 7

Распределение ароматических хромофорных групп в ГАФД и ЛДГ при определении методом пертурбации 20% этиленгликолем в диапазоне спектра 270—300 нм

Хромофорные группы	ГАФД		ЛДГ	
	тирозин	триптофан	тирозин	триптофан
Всего	36	16	32	20
Открытые	16	8	20	8
Закрытые	20	8	12	12

число остатков триптофана и меньшее количество тирозина находятся в положении, доступном действию 20% этиленгликоля. В ЛДГ меньше остатков триптофана и больше остатков тирозина обнаруживается в положении, недоступном действию растворителя. Эти данные характеризуют общее распределение этих функциональных групп, но не показывают какой-либо специфичности в отношении каждой отдельной группы.

Для изучения реакционной способности отдельных остатков тирозина использовали их реакцию с йодом. Доктор Libor [16] показала, что только $\frac{2}{3}$ общего числа остатков

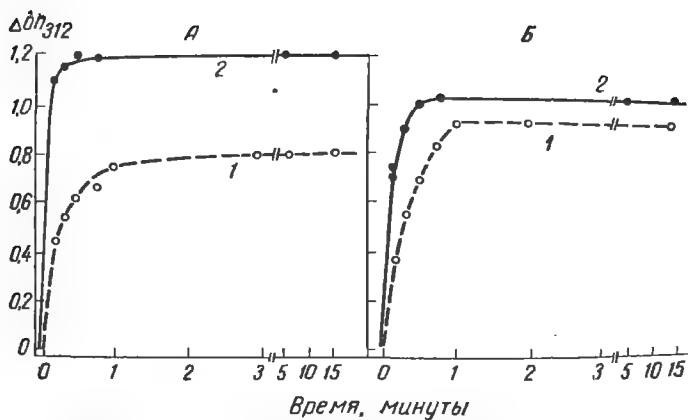


Рис. 11. Кинетика реакции йодирования ЛДГ и ГАФД [16]. Концентрация белка 0,7 мг/мл. Отношение белок: KI_3 1 : 130. 1 — в 0,1 М глициновом буфере pH 9,2; 2 — в 6 М мочеvine pH 9,2; А — ЛДГ; Б — ГАФД.

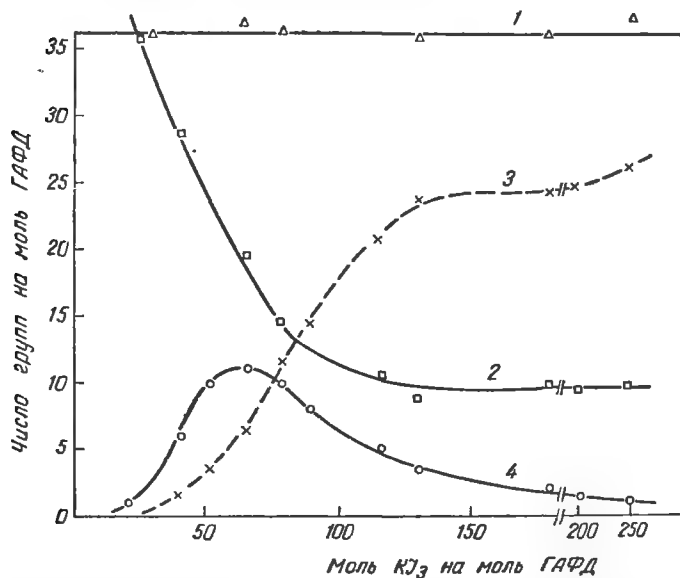


Рис. 12. Зависимость степени йодирования ГАФД остатков тирозина ГАФД от величины молярного избытка KI_3 . Концентрация белка 0,7 мг/мл в 0,2 М боратном буфере pH 9,2.

1 — тирозин + монойодтирозин + дийодтирозин; 2 — тирозин; 3 — дийодтирозин; 4 — монойодтирозин.

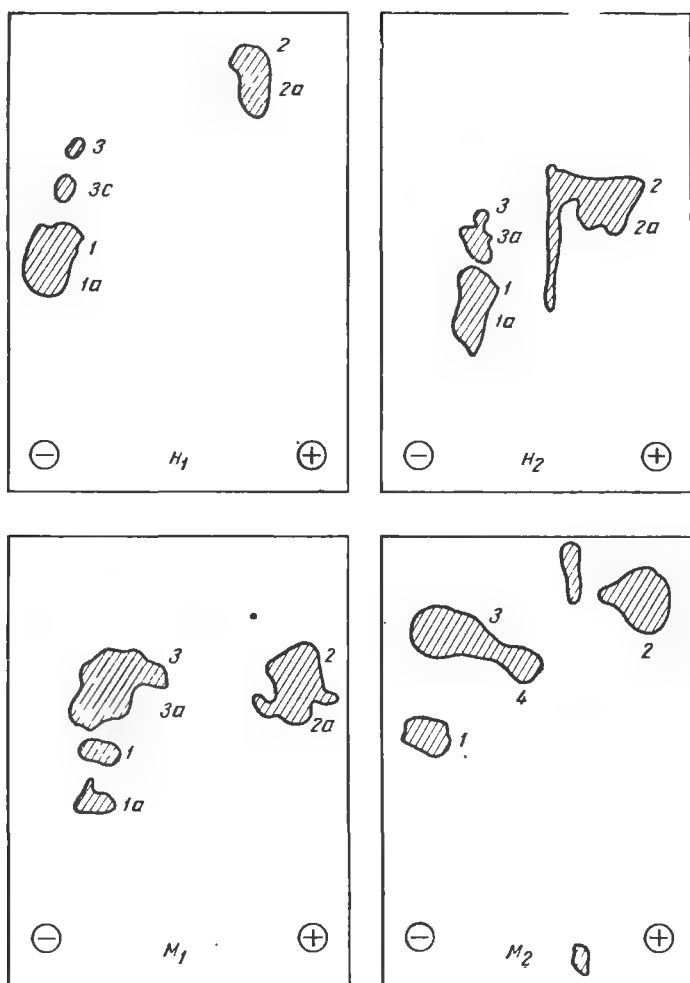


Рис. 13. Радиоавтограммы тирозинсодержащих пептидов ГАФД, меченных йодом-131. Белок реагировал с $K^{131}I$ в боратном буфере, pH 9,2 в течение 30 секунд или 30 минут (H_1 и H_2 , соответственно) и 7 М мочеvine, pH 9,2 (M_1 и M_2 , соответственно). Меченые белки подвергали действию трипсина, пептиды гидролизата разделяли с помощью электрофореза на бумаге при pH 6,5 в одном направлении и хроматографии в системе бутанол — уксусная кислота — вода в направлении 2.

тирозина, приходящихся на одну субъединицу, реагирует в ГАФД с йодом без предварительной обработки мочевиной (рис. 11). Реакция тирозина с йодом может приводить к образованию как моно-, так и диодзамещенных производных в зависимости от некоторых конкретных условий. В полярной среде образуется относительно стабильное монойодпроизводное, в то время как неполярная среда благоприятствует образованию дизамещенных производных [19]. Если это так, то образование моно- или диодтирозинов позволяет получить данные не только о пространственном расположении боковых цепей остатков тирозина, но также об их микроокружении в данном белке. Libog установила, что в ГАФД образуется как моно-, так и диодтирозин [20]. При низкой концентрации KI или при кратковременном действии йода, по-видимому, преобладает относительно стабильное монопроизводное (рис. 12), в то время как увеличение концентрации независимо от продолжительности инкубирования или концентрации йода сдвигает реакцию в сторону образования диодтирозина. В тех случаях, когда реакцию проводят с радиоактивным йодом-132, после триптического гидролиза, можно идентифицировать на пептидной карте пептиды, которые содержат меченые остатки тирозина.

В тех случаях, когда ГАФД обрабатывали радиоактивным йодом в 6 М мочеvine, в радиоавтограммах наблюдали 4 радиоактивных пептида и сильно меченное соединение (рис. 13, M_2). Как показало спектрофотометрическое определение, все эти радиоактивные пептиды содержали диодпроизводные. Аминокислотный анализ показал, что пептиды № 1 и 2 являются гомологами (табл. 8), которые

Таблица 8

Аминокислотный состав тирозинсодержащих пептидов № 1—3, меченных йодом спустя 30 секунд после обработки 0,1 М боратым буфером pH 9,2^[20]

Аминокислота	Номер пептида		
	1	2	3
Лиз	2	1	1
Асп	2	2	2
Сер			1
Лей			1
Изолей	1	1	
Тир	1	1	1

отличаются лишь одним остатком лизина. Кратковременное действие (30 секунд) йодом в отсутствие мочевины привело к появлению 3 пар пятен (рис. 13, H_1).

Из аминокислотного анализа меченых пептидов следовало, что радиоактивные пары пятен являются производными одного и того же пептида и отличаются лишь степенью замещения. Верхняя пара — это пептиды, содержащие остаток дийодтирозина, в то время как нижняя пара — монойодпроизводное того же самого пептида. Следует обратить внимание на тот факт, что Libor удалось выделить пептиды, содержащие монойодтирозин. Это представляет большой интерес и является предметом дальнейших исследований.

После кратковременного действия йодом пептид № 3 был мечен слабее, чем два других. Это может означать, что реакционная способность остатков тирозина в этих двух пептидах различна, один из них (в пептиде № 1 и 2) реагирует легче и его можно модифицировать избирательно. В этих случаях, когда продолжительность действия йодом в отсутствие мочевины увеличивали до 90 секунд, обнаруживали сильное включение метки в пятно, находящееся на старте.

На основании аминокислотного анализа меченых пептидов было установлено положение тирозиновых остатков в аминокислотной последовательности (табл. 9). Остаток тирозина в пептидах № 1 и 2, которые реагируют первыми, относится к фрагменту 252—257 аминокислотной последовательности (тир-252). Этот небольшой пептид содержит главным образом полярные боковые цепи. Пептид № 3 содержит тирозин-137 и имеет также полярный характер. Они являются теми 2 тирозинами, которые образуют относительно стабильное монозамещенное производное.

Т а б л и ц а 9

Тирозинсодержащие пептиды глицеральдегидфосфатдегидрогеназы

Пептид № 1 и 2	252
	Тир—асп—асп—илей—лиз—лиз
Пептид № 3	137
	Тир—асп—асп(NH_2)—сер—лей—лиз
«Стартовый» пеп- тид	25
	Вал—асп—илей—вал—ала—илей—асп(NH_2)— 39
	асп—про—фал—илей—асп—лей—гис—тир—
	мет—вал—тир—мет—фал—глу—тир—асп— сер—трео—гис—глу—лиз . . .

Однако пептид, находящийся в районе старта, имеет менее полярный характер, чем вышеуказанные пептиды. Он содержит три тирозиновых остатка и ни один из них нельзя обнаружить спектрофотометрически в виде моноiodопродукта. Пептид является фрагментом 25—52-й последовательности и содержит остатки тирозина — 39, 42 и 46.

Различное поведение остатков тирозина полностью согласуется с тем фактом, что продукт йодирования действительно определяется полярностью среды. Местное окружение этих остатков может объяснить разную реактивность тирозинов. По-видимому, полярная среда благоприятствует монозамещению, в то время как менее полярная среда вызывает образование двузамещенного соединения.

В отсутствие мочевины еще один тирозин реагирует с йодом. Это может быть остатком тирозина-311 либо тирозина-317:

лей-илей-сер-трип-тир-асп-асп(NH_2)-глу-фал-гли-тир-сер-асп-
арг.

Выделить этот пептид в достаточном для анализа количестве не удалось.

Полученные данные позволяют рассмотреть расположение тех тирозинов, которые реагируют с йодом в присутствии мочевины. Два из неактивных остатков тирозинов можно весьма удачно идентифицировать, это тирозин-91 и тирозин-272. Третий неактивный тирозин может быть остатком тирозина либо 311, либо 317. Независимо от того, закрыты эти группы или взаимодействуют с другими функциональными группами белка (что мешает йодированию), этот тирозин все еще не обнаружен.

В заключение будут кратко рассмотрены предварительные данные об остатках триптофана. Согласно данным Nagai, Perham, из указанных трех остатков триптофана ГАФД только остаток триптофан в положении 310 находится в строго сохранившейся последовательности [4], по-видимому, это триптофан, который участвует в предполагаемом образовании комплекса с переносом заряда НАД [7]. Из этого следует, что триптофан-310 должен быть расположен где-то вблизи активного центра, т. е. во внешней части молекулы.

Мы поставили несколько предварительных опытов для того, чтобы найти, какой триптофан находится в положении, доступном для окисления N-бромсукцинимидом. Нам успешно удалось специфически окислить при pH 6,0 один трипто-

фан на 1 субъединицу. На следующей стадии нужно было определить, какой остаток подвергался окислению. Для того чтобы это сделать, окисленную ГАФД подвергали действию трипсина и при pH 6,5 разделяли пептиды с помощью электрофореза. Триптофансодержащие пептиды обнаруживали на бумаге с помощью п-диметиламинобензальдегида. Оказалось, что в пептидной карте окисленного фермента присутствовало 2; а не 3 триптофансодержащих пептида. Отсутствовал пептид, который в гидролизате нативного фермента двигался к катоду, что указывало на его весьма сильный положительный заряд. Из данных аминокислотной последовательности известно, что ГАФД содержит только один триптофансодержащий пептид, который положительно заряжен при pH 6,5 [4]. Это небольшой пептид, состоящий из 3 аминокислотных остатков, а именно лейцил-триптофаниларгинин. Остаток триптофана занимает положение в полипептидной цепи.

Из этих данных можно сделать вывод о том, что триптофан-193 расположен во внешней части молекулы, однако этот вопрос должен быть исследован дополнительно.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Elődi P., Szőrenyi E.* Acta Physiol. Acad. Sci. J. Hung., 1956, **9**, 339.
2. *Jecsei G.* Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 1961, **20**, 339.
3. *Davidson B., Sajgo M.* et al. Nature, 1967, **216**, 1181.
4. *Harris J., Perham R.* Nature, 1968, **219**, 1025.
5. *Harris J., Meriwether B., Park J.* Nature, 1963, **197**, 154.
6. *Boross L., Cseke E.* Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 1967, **2**, 47.
7. *Cilento G., Tedeschi P.* J. Biol. Chem., 1961, **236**, 907.
8. *Harris J., Polgar L.* J. Mol. Biol., 1965, **14**, 630.
9. *Park J., Agnello C., Matthew E.* J. Biol. Chem., 1965, **240** PC 3232; 1966, **241**, 769.
10. *Park J., Meriwether B., Halcomb S.* Abstr. 7th Internat. Congr. Biochem. Tokyo, 1967, F 283.
11. *Móra S., Hüvös P., Libor P.* Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 1969, **4**, 151.
12. *Harris J.* В кн.: Goodwin T. W., Harris J. I., Hartley B. S. (editors) Structure and Activity of Enzymes, Academic Press. London — New York, 1964, p. 97.
13. *Smith E.* В кн.: Thoai N. V., Roche J. (editors) Homologous Enzymes and Biochemical Evolution, Gordon and Breach Sci. Publ. New York — London — Paris, 1968, p. 43.
14. *Ovádi J., Libor S., Elődi P.* Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 1967, **2**, 455.
15. *Elődi P.* В кн.: Thoai N. V., Roche J. (editors) Homologous Enzymes, and Biochemical Evolution, Gordon and Breach Sci. Publ. New York — London — Paris, 1968, p. 105.

16. Libor S., Elödi P., Nagy Z. Biochim. Biophys. Acta, 1965, 110, 484.
17. Móra S., Elödi P. Europ. J. Biochem., 1968, 5, 574.
18. Herskovits T., Laskowski M. J. Biol. Chem., 1962, 238, 244.
19. Perlman R., Edelhoch H. J. Biol. Chem., 1967, 242, 2423.
20. Elödi P., Libor S., Móra S. 4th FEBS Meeting. Prague, Symp. No 1, 1968.
21. Perham R. Biochem. J., 1969, 111, 17.
22. Harrington W., Karr G. J. Mol. Biol., 1965, 13, 885.
23. Appella E., Markert C. Biochim. Biophys. Res. Comm., 1961, 6, 171.

КОФЕРМЕНТНАЯ И РЕГУЛЯТОРНАЯ ФУНКЦИИ НИКОТИНАМИДАДЕНИННУКЛЕОТИДОВ. КИНЕТИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

Б. И. КУРГАНОВ

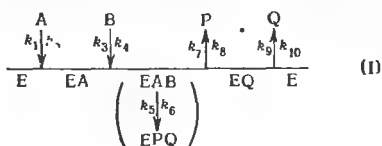
*Всесоюзный научно-исследовательский витаминный
институт, Москва*

Основная функция никотинамидадениннуклеотидов состоит в том, что они принимают прямое участие в ферментативном окислении или восстановлении соответствующих субстратов, выступая в роли коферментов. С открытием аллостерической регуляции [1, 2] стало ясно, что метаболиты (в том числе и коферменты) могут выступать в роли регуляторов ферментативных процессов, контролируя активность определенных ферментов, получивших название регуляторных. Будучи структурно несходными с субстратами реакции, катализируемой регулярным ферментом, метаболиты-регуляторы связываются на особом, аллостерическом центре, и их влияние на активный центр является косвенным: оно опосредуется конформационными изменениями молекулы белка. Метаболиты-регуляторы, действующие подобным образом, получили название аллостерических эффекторов. Информация о механизмах коферментной и регуляторной функций никотинамидадениннуклеотидов может быть получена на основе изучения кинетики реакций, катализируемых ферментами, для которых никотинамидадениндинуклеотиды выступают в роли кофермента или аллостерического эффектора. В настоящем обзоре обсуждаются кинетические подходы к изучению обеих функций никотинамидадениннуклеотидов.

Кинетика реакций, катализируемых НАД- и НАДФ-зависимыми дегидрогеназами

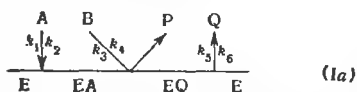
Реакции, катализируемые НАД- и НАДФ-зависимыми дегидрогеназами, с кинетической точки зрения можно рассматривать как двухсубстратные реакции, протекающие с

участием субстрата и кофермента, выполняющего роль второго субстрата. Если считать, что для образования продукта требуется одновременное связывание молекул кофермента и субстрата на поверхности фермента, то превращение 2 субстратов может протекать по двум альтернативным механизмам, один из которых включает упорядоченное связывание субстратов, а другой — неупорядоченное. С помощью диаграмм Cleland эти два механизма можно представить следующим образом [3]. Для упорядоченного присоединения субстратов и упорядоченного отщепления продуктов диаграмма Cleland имеет следующий вид:

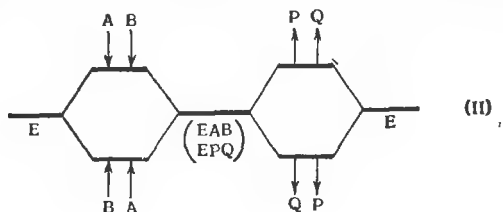


Сначала присоединяется субстрат А с образованием бинарного комплекса ЕА, затем субстрат В с образованием тройного комплекса ЕАВ; отщепление продуктов также происходит упорядоченно.

В том случае, когда константы скорости трансформации тройного комплекса k_5 и k_6 намного превышают константы скоростей распада бинарных комплексов k_2 и k_9 и когда тройные комплексы менее устойчивы, чем бинарные (т. е. $k_5 k_7 \gg k_6 k_9$; $k_5 \gg k_9$; $k_7 \gg k_9$; $k_4 k_6 \gg k_2 k_5$; $k_6 \gg k_2$; $k_4 \gg k_2$), мы приходим к так называемому механизму Теорела—Чанса, для которого считается кинетически несущественным образование тройного комплекса [4]:



Альтернативным является механизм, в котором присоединение субстратов и отщепление продуктов происходит неупорядоченно:



Будем считать в дальнейшем, что лимитирующей стадией в этом процессе является трансформация тройного комплекса.

Оба механизма приводят к одинаковому выражению зависимости начальной скорости реакции от начальных концентраций субстратов, которое удобно представить в следующем виде [5]:

$$\text{Для прямой реакции} \quad \frac{V_f}{v} = 1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_{AB}}{[A][B]}, \quad (1)$$

$$\text{для обратной реакции} \quad \frac{V_r}{v} = 1 + \frac{K_Q}{[Q]} + \frac{K_P}{[P]} + \frac{K_{PQ}}{[P][Q]}, \quad (2)$$

где v — начальная скорость, V_f и V_r — максимальные скорости для прямой и обратной реакций соответственно, K_A — константа Михаэлиса для реагента А при насыщающей концентрации В, K_B — константа Михаэлиса для реагента В при насыщающей концентрации А. Константы K_P и K_Q имеют аналогичный смысл.

Параметры этих уравнений определенным образом связаны с константами скоростей отдельных стадий. Например, для общего механизма с упорядоченным связыванием субстратов (механизм 1) выполняются следующие соотношения:

$$V_f = [E]_0 \frac{k_7}{1 + k_7/k_9 + (k_6 + k_7)/k_5}, \quad (3)$$

$$K_A = \frac{k_7}{k_1[1 + k_7/k_9 + (k_6 + k_7)/k_5]}, \quad (4)$$

$$K_B = \frac{k_4 k_6 + k_4 k_7 + k_5 k_7}{k_3 k_5 [1 + k_7/k_9 + (k_6 + k_7)/k_5]}, \quad (5)$$

$$K_{AB} = \frac{k_2}{k_1} K_B, \quad (6)$$

где $[E]_0$ — общая концентрация фермента. Интересно отметить, что в случае упорядоченного связывания параметр K_{AB} равен произведению константы диссоциации бинарного комплекса ЕА, равной отношению $k_2 k_1$, на константу Михаэлиса для реагента В. Следовательно, из кинетических данных можно рассчитать константы диссоциации бинарных комплексов ЕА и ЕQ.

В случае механизма Теорела — Чанса (механизм 1а) между параметрами уравнений (1) и (2) существует определенное соотношение:

$$\frac{K_A K_B}{K_{AB}} = \frac{K_{PQ}}{K_P K_Q} = \frac{V_f}{V_r}. \quad (7)$$

Кроме того, для всех трех механизмов (I, Ia и II) справедливо так называемое соотношение Холдена, связывающее

константу суммарного равновесия с некоторыми из параметров уравнений (1) и (2):

$$K_{\text{равн}} = \frac{K_{\text{PQ}} V_f}{K_{\text{AB}} V_r}. \quad (8)$$

Для механизма Теорела — Чанса наряду с этим соотношением Холдена выполняется еще одно:

$$K_{\text{равн}} = \frac{K_Q K_P}{K_A K_B} \left(\frac{V_f}{V_r} \right)^3. \quad (9)$$

Указанные соотношения наряду с полученными из кинетических данных константами диссоциации бинарных комплексов EA и EQ могут быть использованы для проверки выполнимости механизма Теорела—Чанса. Именно таким путем была доказана выполнимость этого механизма для алкогольдегидрогеназы печени лошади [6]. Для этого фермента существует принудительная последовательность связывания компонентов реакции, причем связывание кофермента предшествует связыванию субстрата, и, кроме того, образование тройного комплекса в этом случае не проявляется кинетически.

Выбор между механизмами с упорядоченным и неупорядоченным связыванием субстратов может быть сделан на основе изучения кинетики ингибирования продуктами реакции. Соответствующий анализ, проведенный Alberty в 1958 г. [7] и более подробно Cleland в 1963 г. [3], показывает, что характер ингибирования продуктами реакции зависит от механизма ферментативного процесса (табл. 10). Для общего упорядоченного механизма отношения реагентов из внешней пары A и Q должны иметь конкурентный характер, а отношения реагентов из внутренней пары — неконкурентный характер (т. е. в присутствии продукта меняется как константа Михаэлиса, так и максимальная скорость). Для механизма Теорела — Чанса конкурентный характер должны иметь отношения реагентов как из внутренней, так и из внешней пары, а для механизма с неупорядоченным присоединением субстратов во всех случаях ингибирование должно иметь конкурентный характер.

Изучение кинетики ингибирования НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ продуктами реакции показывает, что для ферментов этого класса, как правило, выполняется принудительная последовательность связывания кофермента и субстрата: связывание кофермента предшествует связыванию субстрата. Первые кинетические данные подобного рода, свидетельствующие в пользу общего механизма упоря-

**Характер ингибирования ферментативной реакции ее
продуктами для механизмов с упорядоченным
и неупорядоченным связыванием субстратов**

Механизм	Ингибирующий продукт	Субстрат, концентрацию которого варьируют в опыте	
		А	В
I	P Q	НК К	НК НК
Ia	P Q	НК К	К НК
II	P Q	К К	К К

НК и К — неконкурентное и конкурентное ингибирование соответственно.

доченного присоединения компонентов реакции, были получены в 1962 г. для рибитолдегидрогеназы [8]. В качестве иллюстрации приведем более новые данные по малатдегидрогеназе из сердца быка, полученные в 1968 г. [9] (рис. 14). Данные представлены в координатах Лайнуивера — Берка. Конкурентные отношения наблюдаются только для НАД и НАДН и, следовательно, в данном случае связывание субстратов и отщепление продуктов является упорядоченным, причем внешней парой является НАД и НАДН.

В качестве примера ферментативной реакции с упорядоченным присоединением субстратов и кинетически не проявляющимся тройным комплексом можно привести реакцию, катализируемую лактатдегидрогеназой (ЛДГ). Zewe, Fromm [10, 11] показали, что для ЛДГ из скелетных мышц кролика отношения реагентов как из внешней, так и из внутренней пары носят конкурентный характер (рис. 15). Следовательно, для ЛДГ выполняется механизм Теорела — Чанса. Однако более детальный анализ этой реакции показал, что максимальная скорость превращения пирувата в лактат, деленная на общую концентрацию фермента, больше константы скорости диссоциации комплекса ЛДГ-НАД [10]. Аналогичная ситуация обнаружена также для глутаматдегидрогеназы [12], дрожжевой алкогольдегидрогеназы [13] и малатдегидрогеназы [9]. Подобное соотношение не имеет физического смысла, поскольку максимальная ско-

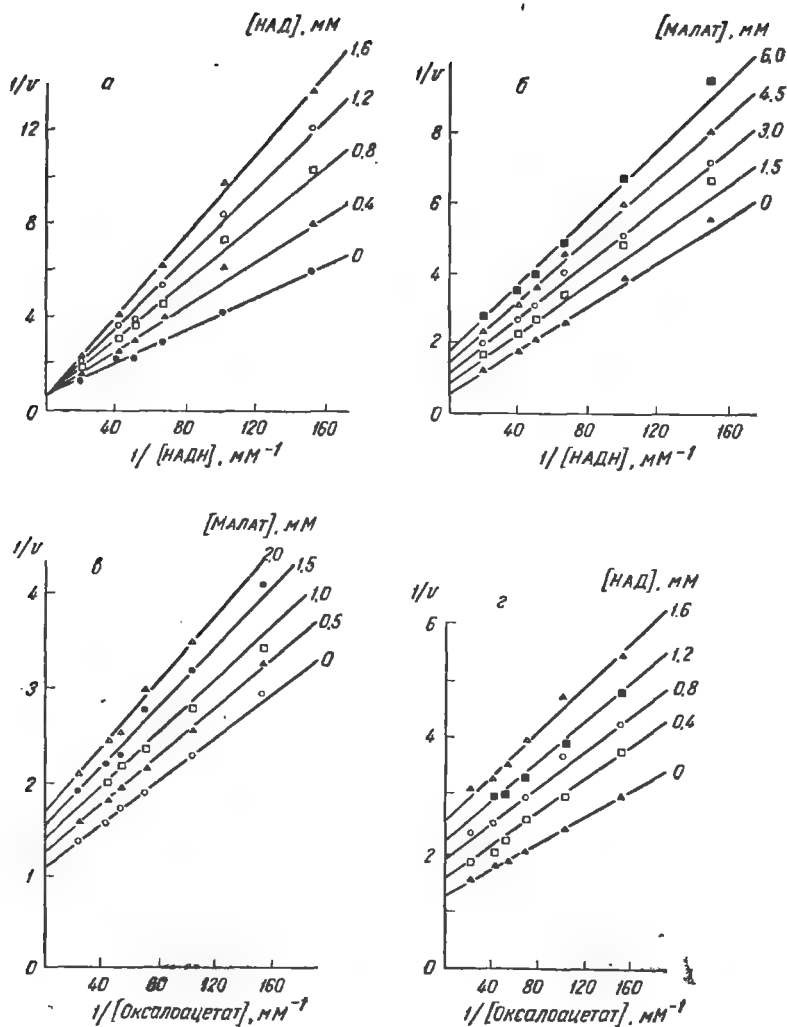


Рис. 14. Ингибирование малатдегидрогеназы из сердца быка продуктами реакции [9]. Ингибирование НАД и малатом процесса ферментативного восстановления оксалоацетата при фиксированной концентрации оксалоацетата (0,02 мМ; а и б) и при фиксированной концентрации НАДН (0,025 мМ; в и г). Трис-ацетатный буфер, рН 8,0; 25°. Размерность v — мкмоль НАДН/мин/мкг белка.

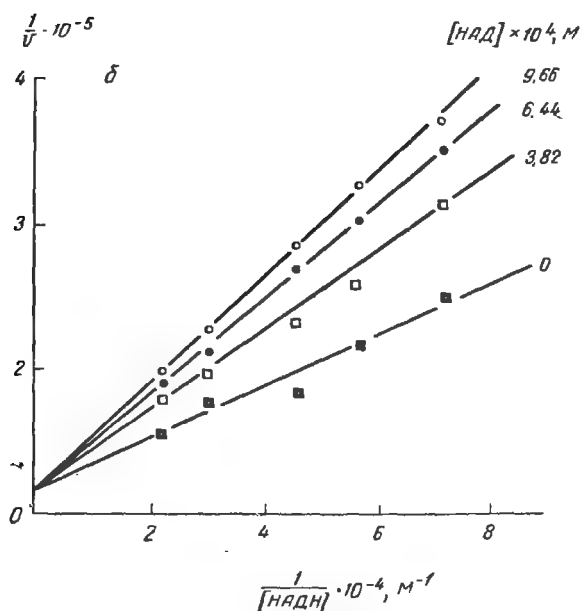
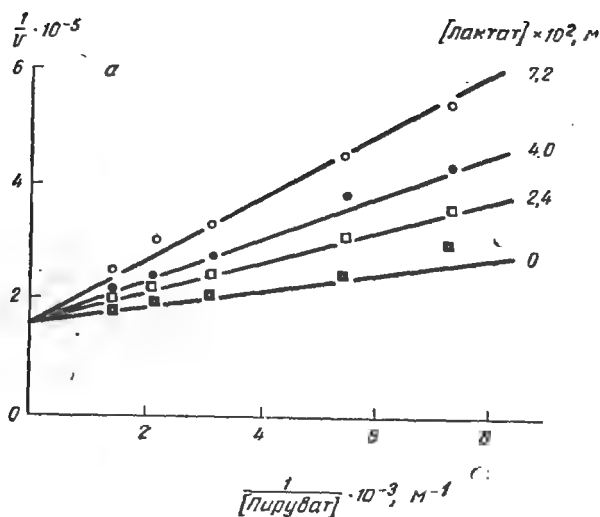
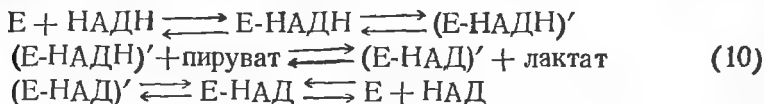


Рис. 15. Ингибирование лактатдегидрогеназы из скелетных мышц кролика продуктами реакции [10].

Ингибирование лактатом и НАД процесса ферментативного восстановления пирувата при фиксированной концентрации НАДН ($4.24 \cdot 10^{-3}$ М; а) и при фиксированной концентрации пирувата ($4.60 \cdot 10^{-4}$ М; б) 0,25 М фосфатный буфер рН 6,8; 28°. Размерность v — моль НАДН/л/10 мин.

рость процесса в определенном направлении не может превышать ни одну из констант молекулярных стадий в этом направлении. Для того чтобы устранить это противоречие, Cieland [3] допустил изомеризацию комплекса фермент-НАД. Схема ферментативного действия ЛДГ с учетом изомеризации комплексов ЛДГ-НАД и ЛДГ-НАДН будет иметь следующий вид [11]:



В этой схеме нереакционноспособные комплексы Е-НАД и Е-НАДН изомеризуются в комплексы, отмеченные штрихами, которые уже способны взаимодействовать с лактатом или пируватом соответственно. Подобная схема действия ЛДГ подтверждается измерениями изотопных кинетических эффектов, проведенными в 1968 г. Palm [14].

Дополнительные подтверждения упорядоченного присоединения кофермента и субстрата для НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ могут быть получены на основе измерения скоростей взаимного превращения восстановленных и окисленных форм субстрата и кофермента для системы, находящейся в равновесии, с помощью введения меченых реагентов [15—19]. В работе [20] изучили таким путем скорости взаимопревращений $\text{НАД} \rightleftharpoons \text{НАДН}$ и $\text{оксалоацетат} \rightleftharpoons \text{малат}$ для находящейся в равновесии реакции, катализируемой малатдегидрогеназой из митохондрий сердца свиньи. С одновременным увеличением концентраций малата и оксалоацетата при сохранении постоянства отношения концентраций этих реагентов скорость их взаимного превращения при рН 8,0 (рис. 16) непрерывно растет, в то время как скорость взаимного превращения НАД и НАДН проходит через максимум и уменьшается практически до нуля. С увеличением концентраций субстратов растет доля тройных комплексов, и падение скорости обмена $\text{НАД} \rightleftharpoons \text{НАДН}$ означает, что выход НАД или НАДН из тройного комплекса невозможен. Эти данные указывают на упорядоченное связывание кофермента и субстрата. Однако при рН 9,0 (рис. 17) скорость обмена $\text{НАД} \rightleftharpoons \text{НАДН}$ при больших концентрациях малата приближается к предельной величине, заметно отличающейся от нуля, что свидетельствует в пользу частично упорядоченного механизма. Таким образом, несмотря на большую распространенность,

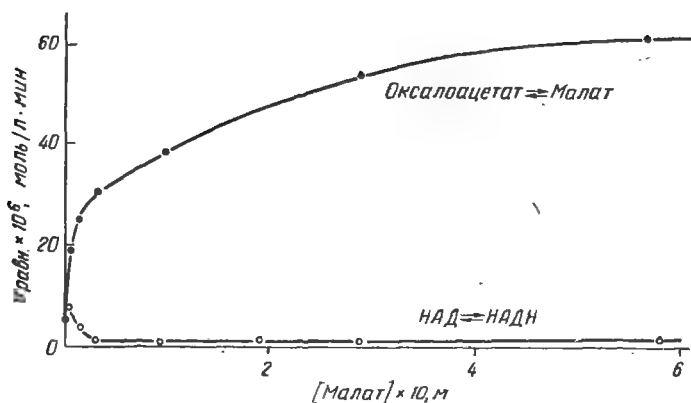


Рис. 16. Скорости взаимного превращения $\text{НАД} \rightleftharpoons \text{НАДН}$ и $\text{малат} \rightleftharpoons \text{оксалоацетат}$ для находящейся в равновесии реакции, катализируемой малатдегидрогеназой из митохондрий сердца свиньи [20]. Отношение концентрации малата и оксалоацетата поддерживалось постоянным и равным 100 : 1; 70 мМ трис- NO_3 буфер, рН 8,0; 1°; реакционная смесь содержала 7,28 мМ НАД, 73,2 мкМ НАДН и 4,2 мкг/мл фермента.

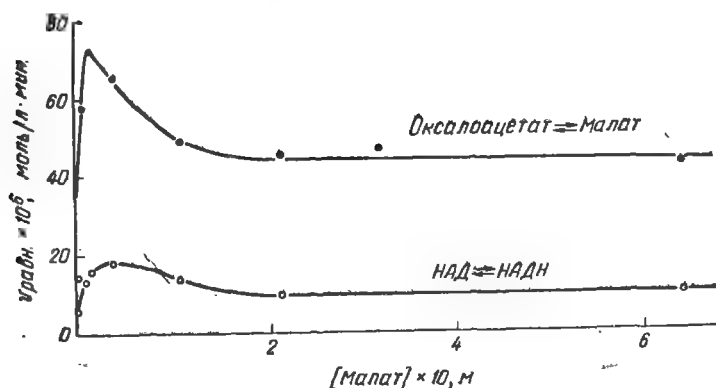


Рис. 17. Скорости взаимного превращения $\text{НАД} \rightleftharpoons \text{НАДН}$ и $\text{малат} \rightleftharpoons \text{оксалоацетат}$ для находящейся в равновесии реакции, катализируемой малатдегидрогеназой из митохондрий сердца свиньи. Отношение концентрации малата и оксалоацетата поддерживалось постоянным и равным 100 : 1; 213 мМ трис- NO_3 буфер, рН 9,0; 1°; реакционная смесь содержала 7,18 мМ НАД, 721 мкМ НАДН и 2,96 мкг/мл фермента.

механизм с упорядоченным связыванием кофермента и субстрата, по-видимому, не является универсальным для всех дегидрогеназ и для всех условий опыта.

Из новых методов, позволяющих получить дополнительную ценную информацию, следует прежде всего отметить методы изучения быстрых химических процессов, например метод «остановленной струи» [21, 22]. Хорошей иллюстрацией возможностей этого метода могут служить данные, полученные для ЛДГ из сердца свиньи [23—26]. При связывании НАДН с ЛДГ происходит смещение максимума НАДН в коротковолновую область, что приводит к снижению экстинкции при 365 нм [24]. Это позволяет проследить за образованием и распадом комплекса ЛДГ-НАДН спектрофотометрическим методом. Gutfreund изучал с помощью метода «остановленной струи» кинетику вытеснения НАДН из комплекса с ЛДГ окисленной формой никотинамидадениндинуклеотида. Одна из типичных кинетических кривых представлена на рис. 18 [25].

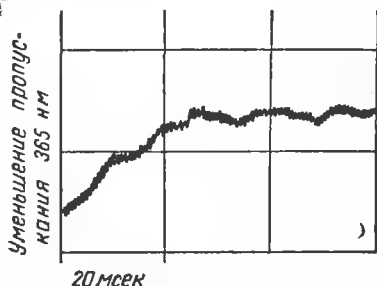


Рис. 18. Вытеснение НАДН из комплекса с ЛДГ никотинамидадениндинуклеотидом, прослеженное методом остановленной струи [25]. 7 мг/мл ЛДГ; $2 \cdot 10^{-4}$ М НАДН; $2 \cdot 10^{-2}$ М НАД; фосфатный буфер рН 7,0.

Изменение оптического поглощения при 365 нм соответствует распаду комплекса ЛДГ-НАДН. С увеличением концентрации НАД скорость распада комплекса ЛДГ-НАДН приближается к предельной величине, соответствующей константе скорости распада этого комплекса. При рН 8,5 она равна 100 сек.^{-1} и точно соответствует максимальной скорости ферментативного превращения лактата в пируват, деленной на общую концентрацию фермента [24]. Следовательно, при этом значении рН лимитирующей стадией ферментативного процесса является диссоциация комплекса ЛДГ-НАДН. При меньших значениях рН максимальная скорость становится меньше константы скорости распада этого бинарного комплекса и, следовательно, лимитирующей становится какая-то другая стадия.

Добавление оксамата, в присутствии которого происходит образование тройного комплекса ЛДГ-НАДН-оксамат, приводит к существенному снижению скорости отщепле-

ния НАДН [24]. По Gutfreund, этот результат указывает на упорядоченное отщепление оксамата и НАДН, причем оксамат отщепляется первым. Поскольку оксамат является конкурентным ингибитором ЛДГ по отношению к пирувату, можно полагать, что комплекс ЛДГ-НАДН-оксамат в определенном смысле имитирует комплекс ЛДГ-НАД-пируват, и поэтому связывание НАДН и пирувата при образовании тройного комплекса также является упорядоченным.

Таким образом, для НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ, как правило, характерна упорядоченная последовательность связывания кофермента и субстрата. Следовательно, центр связывания субстрата формируется при образовании комплекса фермента с коферментом.

Регуляторная функция никотинамидадениннуклеотидов и аллостерические свойства НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ

Никотинамидадениннуклеотиды могут выступать в роли регуляторов ферментативных процессов. НАДН контролирует активность ряда ферментов, использующих в качестве субстратов оксалоацетат и малат: цитрат-синтазы (КФ 4.1.3.7) [27—29], малатдегидрогеназы (декарбоксилирующей) [30, 31], малатдегидрогеназы [32], фосфопируваткарбоксилазы [33] и пируваткарбоксилазы (КФ 6.4.1.1) [34].

Согласно Wright, Sanwal [33], уровень содержания НАДН характеризует интенсивность процессов гликолиза, и ингибирование фосфопируваткарбоксилазы НАДН обеспечивает торможение глюкогенеза в том случае, когда гликолиз становится эффективным. Кривые зависимости начальной скорости реакции, катализируемой фосфопируваткарбоксилазой (КФ 4.1.1.31) из *Escherichia coli* от начальных концентраций субстратов — оксалоацетата, NaHCO_3 и фосфоенолпирувата, подчиняются гиперболической зависимости, однако в присутствии аллостерического ингибитора — НАДН они приобретают S-образный характер (рис. 19).

Аналогичная картина наблюдается и для НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы (декарбоксилирующей) (КФ 1.1.1.40) из *Escherichia coli* [31]. Гиперболические зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации малата превращаются в S-образные при добавлении аллостерического ингибитора — НАДН. В координатах Лайнуи-

вера — Берка S-образным кривым соответствуют кривые, выпуклые к оси абсцисс (рис. 20).

Из указанных выше ферментов особый интерес представляет малатдегидрогеназа (КФ 1. 1. 1. 37) из *Escherichia coli*, поскольку в данном случае НАДН выступает не только в роли кофермента для обратной реакции, но и в роли аллостерического ингибитора для обоих направлений реакции [32]). Кривые зависимости скорости реакции от концентрации малата приобретают S-образный характер при добавлении НАДН (рис. 21). Для обратной реакции кривые зависимости скорости реакции от концентрации оксалоацетата S-образны в интервале концентрации НАДН от 0,013 до 0,65 мМ. Вне этого концентрационного интервала кривые подчиняются гиперболической зависимости (рис. 22). Большие концентрации НАДН ингибируют малатдегидрогеназу. На основании анализа кинетических данных Sapwal [32] пришел к выводу, что ингибирование прямой и обратной реакций НАДН имеет аллостерическую природу: молекула фермента содержит аллостерический центр, связывание НАДН (а также АМФ, АДФ и АТФ), на котором приводит к изменению каталитических свойств активного центра.

В работе [35] было показано, что НАДН является аллостерическим ингибитором фосфат-ацетилтрансферазы (КФ 2.3.1.8) из *Escherichia coli*, причем в присутствии НАДН зависимость v от концентрации субстрата — ацетилфосфата принимает S-образный характер. В работе [36] обнаружено ингибирующее действие НАДН по отношению к пируваткиназе (КФ 2.7.1.40) из печени крысы. НАД также может выполнять регуляторную функцию. Например, глутаминсинтетаза (КФ 6.3.1.2) ингибируется НАД по аллостерическому механизму [37].

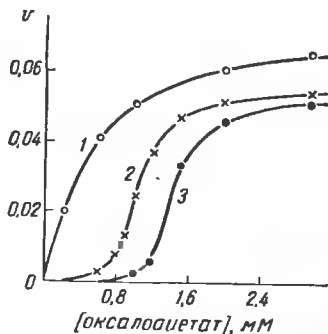


Рис. 19. Зависимость скорости реакции, катализируемой фосфопироваткарбоксилазой, от концентрации субстрата, оксалоацетата, при различных концентрациях аллостерического ингибитора — НАДН [33].

10 мМ $MgCl_2$; 3,5 мМ АТФ; 20 мМ $NaHCO_3$; 0,1 М трис-НСI буфер, pH 7,5; 31°. Концентрация НАДН (в мМ). 1—0; 2—0,75 и 3—1,0; Размерность v — микромоли обмениваемой $^{14}CO_2$ в минуту.

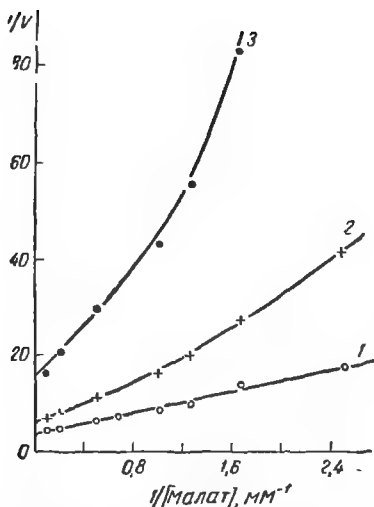


Рис. 20. Зависимость скорости реакции, катализируемой малатдегидрогеназой (декарбоксилирующей), от концентрации малата в координатах Лайнуивера — Берка при различных концентрациях аллостерического ингибитора — НАДН [31].

1 mM $MnCl_2$; 0,075 M трис-HCl буфер, pH 7,5; 0,077 mM НАДФ. Концентрация НАДН: 0 mM (1); 0,26 mM (2); 0,49 mM (3).

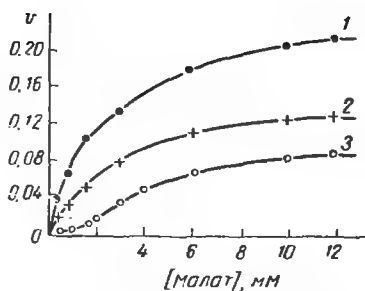


Рис. 21. Зависимость скорости реакции, катализируемой малатдегидрогеназой, от концентрации субстрата — малата при различных концентрациях аллостерического ингибитора — НАДН [32].

0,015 M ЭДТА; 0,15 M трис-ацетат буфер, pH 9,0; 0,18 mM НАД. Концентрация НАДН: 0 mM (1); 0,026 mM (2); 0,065 mM (3).

НАДН и НАДФН могут выступать и в роли аллостерических активаторов. НАДН активирует, например, фосфорибулокиназу (КФ 2. 7. 1. 19) из *Hydrogenomonas facilis* [38] и *Rhodopseudomonas spheroides* [39], а НАДФН — АДФ-глюкозопирофосфорилазу из *Escherichia coli* [40]. Зависимость скоростей реакций, катализируемых этими ферментами, от концентрации аллостерического активатора — НАДН или НАДФН носит S-образный характер (рис. 23).

Все известные в настоящее время регуляторные ферменты построены из субъединиц и содержат несколько активных и аллостерических центров в молекуле. Кооперативная кинетика, т. е. S-образные кривые зависимости скорости реакции, катализируемой регуляторным ферментом, от концентрации субстрата или аллостерического эффектора, как правило, объясняется кооперативным взаимодействием активных и аллостерических центров.

Хорошей иллюстрацией важности наличия четвертичной структуры у регуляторных ферментов служат данные Weitzman по цитрат-синтетазе, представляющей собой ключевой фермент цикла трикарбоновых кислот [29]. Оказалось, что цитрат-синтазы из различных источников различаются по молекулярным весам (например, молекулярный вес фермента из *Acinetobacter lwoffii* составляет около 250 000, а фермента из сердца свиньи — около 80 000), и чувствительностью к аллостерическому ингибитору — НАДН обладают лишь цитрат-синтазы с большим молекулярным весом.

Никотинамидадениннуклеотиды могут выполнять регуляторную функцию, связываясь не только на аллостерическом центре, но и на активном. Это, очевидно, возможно в том случае, когда молекула фермента содержит несколько активных центров и каждый из центров выступает по отношению к другим как аллостерический. Взаимодействия активных центров проявляются в отклонениях от закона Михаэлиса—Ментен. Если взаимодействия активных центров положительны (т. е. связывание кофермента или субстрата на одном из центров приводит к увеличению каталитической

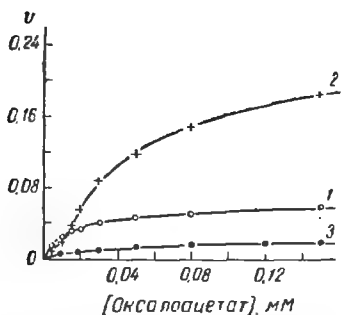


Рис. 22. Зависимость скорости реакции, катализируемой малатдегидрогеназой, от концентрации субстрата — оксалоацетата при различных концентрациях кофермента — НАДН [32].

0,015 М ЭДТА; 0,15 М трис-ацетат буфер, рН 7,4. Концентрация НАДН: 0,013 мМ (1); 0,32 мМ (2); 0,65 мМ (3).

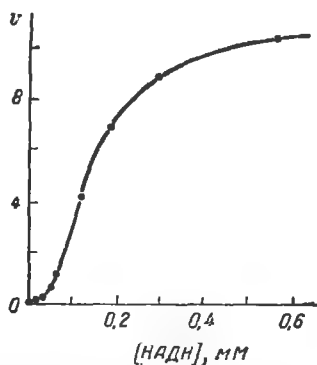


Рис. 23. Зависимость скорости фиксации CO_2 , катализируемой фосфорibuлокиназой из *Rhodospseudomonas spheroides*, от концентрации аллостерического активатора — НАДН [38].

Трис-НCl буфер, рН 8,0; 30°. Размерность v — число импульсов в минуту.

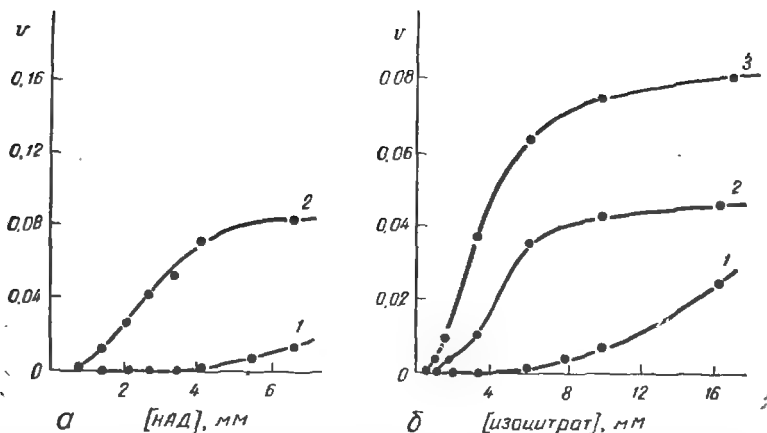


Рис. 24. Зависимость скорости ферментативной реакции (v), катализируемой НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназой из *Blastocladiella emersonii*, от концентрации НАД (а) и изоцитрата (б) [41].

а — концентрации изоцитрата (мМ); 1 — 1,66; 2 — 3,33; б — концентрации НАД (мМ); 1 — 0,2; 2 — 0,66; 3 — 3,33.

Условия опытов: 0,15 М трис-ацетатный буфер, pH 8; 3,33 мМ Mg^{2+} . Размерность v — единица оптической плотности в минуту.

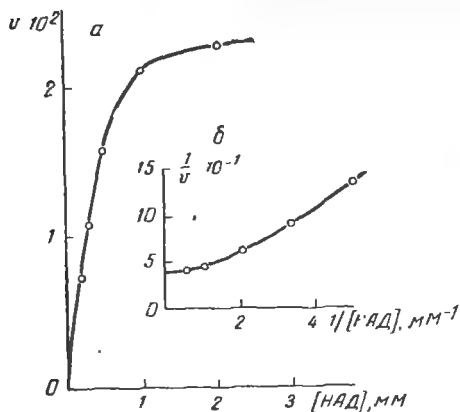


Рис. 25. Зависимость скорости ферментативной реакции (v), катализируемой НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназой из брюквы, от концентрации НАД в координатах $v \div [NAD]$ (а) и $1/v \div 1/[NAD]$ (б) [42].

Условия опыта: 0,1 М трис-буфер pH 7,4; 1 мМ $MgSO_4$. Размерность v — единица оптической плотности в минуту.

эффективности других центров) и достаточно сильны, то зависимость скорости ферментативной реакции от начальной концентрации кофермента или субстрата будет иметь S-образный характер. В качестве примера на рис. 24 представлены S-образные кривые зависимости v от концентраций НАД и изоцитрата для НАД-зависимой изоцитратдегидро-

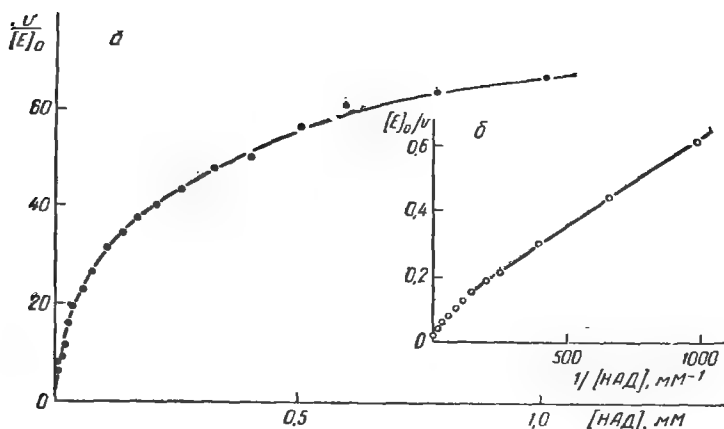


Рис. 26. Зависимость удельной активности ($v/[E]_0$) глутаматдегидрогеназы из печени быка от концентрации НАД в координатах $v/[E]_0 \div [НАД]$ (а) и $[E]_0/v \div 1/[НАД]$ (б) [43].

Фосфатный буфер, рН 7,0; $\mu = 0,25$; 25°; 50 мМ глутамат.

геназы (КФ 1. 1. 1. 41) из *Blastocladiella emersonii* [41]. В случае НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы из брюквы взаимодействия активных центров не настолько сильны, чтобы зависимость от концентрации НАД стала S-образной [42] (рис. 25). Однако зависимость $1/v$ от $1/[НАД]$ является не линейной, а выпуклой к оси абсцисс (рис. 25). Иной тип отклонений от закона Михаэлиса обнаружен в работе [43] для глутаматдегидрогеназы (КФ 1. 4. 1. 2) из печени быка. Зависимость v от концентрации НАД также не является S-образной, однако зависимость $1/v$ от $1/[НАД]$ имеет вид кривой, выпуклой к оси ординат (рис. 26).

Авторы предполагают, что в данном случае связывание кофермента на одних центрах приводит к уменьшению сродства других центров к коферменту (отрицательные взаимодействия). Существует еще один тип отклонений от закона Михаэлиса, обусловленных взаимодействием активных центров в молекуле фермента. Этот тип отклонений характеризуется наличием двух точек перегиба на кривой зависимости v от концентрации субстрата (в некоторых случаях даже наличием плато при промежуточных степенях насыщения фермента субстратом). В качестве примера на рис. 27 приведены зависимости v от концентрации НАД для глутаматдегидрогеназы из *Blastocladiella emersonii* [44]. Как видно из рисунка, с увеличением концентрации

НАД скорость ферментативной реакции начинает приближаться к некоторому пределу, однако, не достигая его, продолжает расти (при достаточно больших концентрациях НАД скорость реакции достигает предельного значения — эта часть кривой на рисунке не представлена). Magar, Ноти [45] обнаружили, что в присутствии аллостерического

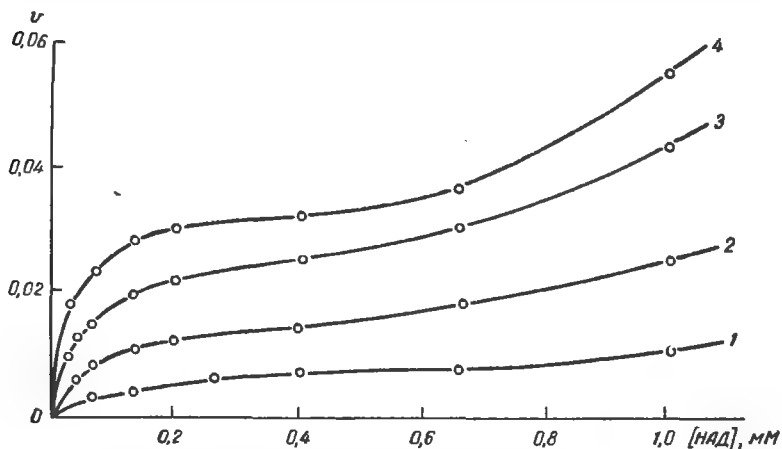


Рис. 27. Зависимость скорости ферментативной реакции, катализируемой глутаматдегидрогеназой из *Blastocladiella emersonii*, от концентрации НАД [43].

0,2 М трис-НСl буфер, pH 9. Концентрация глутамата: 0,33 мМ (1); 1,33 мМ (2); 3,34 мМ (3); 16,66 мМ и 33,3 мМ (4). Размерность v — единица оптической плотности в минуту.

ингибитора — фолиевой кислоты гиперболическая кривая зависимости скорости ферментативной реакции, катализируемой НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназой из сердца свиньи, превращается в кривую с двумя точками перегиба. Для объяснения кривых зависимости v от $[S]_0$ с двумя точками перегиба Teipel, Koshland предположили, что в подобных случаях по мере заполнения активных центров в молекуле фермента сродство к субстрату или величина константы скорости распада фермент-субстратного комплекса сначала снижается («отрицательная кооперативность»), а затем растет «положительная кооперативность» [46].

Многие из НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ являются регуляторными ферментами, т. е. специфически регулируются в живой клетке определенными метаболитами.

Регуляторные свойства проявляют гомосериндегидрогеназа (КФ 1.1.1.3), глутамат- и изоцитратдегидрогеназы [1], глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.8) [47—49], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.49) [50—52], ИМФ-дегидрогеназа (КФ 1.2.1.14) [53, 54], малатдегидрогеназы (декарбоксилирующие) [31, 55—57], малатдегидрогеназа [32], лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27) [58—60] и D-лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.28) [61, 62].

Обсуждавшаяся выше малатдегидрогеназа (декарбоксилирующая) из *Escherichia coli* ингибируется по аллостерическому механизму не только НАДН, но и ацетил-КоА и оксалоацетатом [31]. В присутствии ацетил-КоА кривая зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата — малата становится S-образной. Кривая зависимости скорости реакции от концентрации ацетил-КоА также обнаруживает S-образный характер [63] (рис. 28).

Для НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы из митохондрий млекопитающих в роли положительного эффектора выступает АДФ, а отрицательного — НАДН [64]. АДФ уменьшает кооперативность по субстрату, в то время как НАДН увеличивает ее. Это особенно хорошо видно, если проанализировать кинетические данные с помощью следующего эмпирического уравнения:

$$v = V_{\max} \frac{([S]_0/[S]_{0,5})^{n_H}}{1 + ([S]_0/[S]_{0,5})^{n_H}}, \quad (11)$$

где $V_{\max} = \lim_{[S]_0 \rightarrow \infty} v$. $S_{0,5}$ — концентрация «полунасыщения» (т. е. концентрация субстрата, при которой $v = V_{\max}/2$), n_H — так называемый коэффициент Хилла.

Параметр n_H , который для S-образных кривых превышает единицу, может служить мерой степени кооперативных взаимодействий центров, связывающих субстрат (с рос-

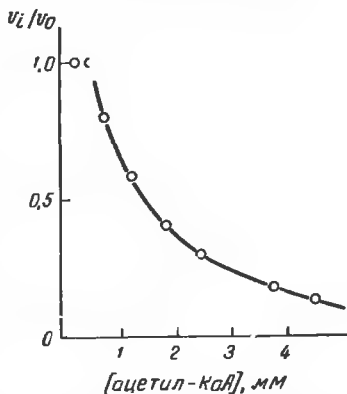


Рис. 28. Ингибирование малатдегидрогеназы (декарбоксилирующей) ацетил-КоА [63].

1,0 МпCl₂; 0,1 М трнс-НСI буфер, рН 7,0; 2,5 мМ малат; 0,03 мМ НАДФ.

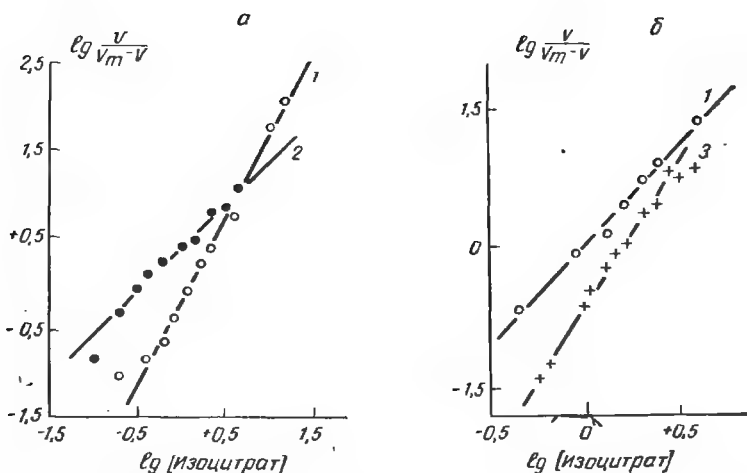


Рис. 29. Зависимость скорости реакции, катализируемой НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназой, от концентрации субстрата — изоцитрата в отсутствие и присутствии аллостерических эффекторов: активатора — АДФ (а) и ингибитора — НАДН (б) [64] (данные представлены в координатах Хилла).

1 — в отсутствие эффекторов, 2 — в присутствии 2,5 мМ АДФ, 3 — в присутствии 0,20 мМ НАДН. 10 мМ фосфат калия, 25 мМ глицилглицин, рН 7,7; 10 мМ $MgCl_2$; 0,67 мМ НАД, v — максимальная скорость.

том силы взаимодействий коэффициент n_H приближается к величине, соответствующей числу субстратных центров в молекуле фермента).

Уравнение (11) спрямляется в координатах $\lg[v/(V_{\max} - v)] \div \lg[S]_0$, причем наклон прямой равен коэффициенту n_H :

$$\lg \frac{v}{V_{\max} - v} = n_H \lg[S]_0 - n_H \lg[S]_{0,5}. \quad (12)$$

В отсутствие эффекторов коэффициент кооперативности, n_H , для изоцитрата близок к 2. В присутствии АДФ кооперативность по субстрату исчезает (n_H становится равным единице; рис. 29, а), в то время как в присутствии НАДН кооперативность увеличивается (n_H достигает 3; рис. 29, б). В свою очередь кооперативность по аллостерическому ингибитору — НАДН зависит от концентрации субстрата. С уменьшением концентрации изоцитрата кооперативность по НАДН исчезает: $n_H = 1,7$ для 2,1 мМ изоцитрата и $n_H = 0,9$ для 0,9 мМ изоцитрата (рис. 30). Коэффициент

кооперативности по эффектору (F) может быть вычислен по уравнению, аналогичному уравнению (11):

$$v_0 - v = (v_0 - v_{\text{пр}}) \frac{([F]_0/[F]_{0,5})^{n_H}}{1 + ([F]_0/[F]_{0,5})^{n_H}}, \quad (13)$$

где v_0 и v — скорости ферментативной реакции в отсутствие и в присутствии эффектора соответственно, $v_{\text{пр}} = \lim_{[F]_0 \rightarrow \infty} v$ и $[F]_{0,5}$ — концентрация эффектора, при которой $v_0 - v = (v_0 - v_{\text{пр}})/2$. При $v_{\text{пр}} = 0$ (F — ингибитор) зависимость $\lg[(v_0 - v)/v]$ от $\lg[F]_0$ должна быть линейной. Наклон в этих координатах дает величину n_H .

Следует отметить, что в тех случаях, когда измерения скорости ферментативной реакции проводятся в достаточно больших интервалах концентраций субстрата или эффектора, обнаруживается непостоянство коэффициента Хилла (снижение n_H до единицы при $[S]_0 \rightarrow 0$ и $[S]_0 \rightarrow \infty$ или $[F]_0 \rightarrow 0$ и $[F]_0 \rightarrow \infty$).

Аллостерические взаимодействия проявляются не только в S-образном характере кривых зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата или аллостерического эффектора. Можно указать еще 2 типа эффектов, имеющих аллостерическую природу. В некоторых случаях наблюдается парадоксальный эффект активации фермента малыми концентрациями аналога кофермента или субстрата. Зависимость скорости ферментативной реакции, катализируемой глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой из эритроцитов человека, от концентрации НАДФ имеет S-образный характер ($n_H = 1,69$), отражающий взаимодействие 2 активных центров в молекуле фермента. В присутствии восстановленной формы НАДФ, которую можно рассматривать как аналог кофермента, S-образная кривая превращается в гиперболическую, и в области малых концентраций кофермента наблюдается активация фермента (рис. 31) [50]. Восстановленная форма НАДФ оказывает двойное действие на фермент: с одной стороны, НАДФН конкурирует с коферментом за одни и те же

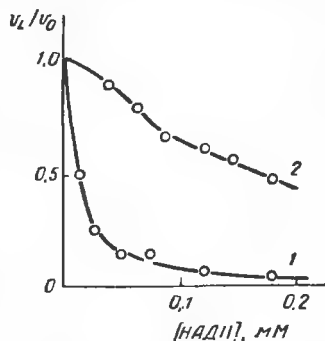


Рис. 30. Ингибирование НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы аллостерическим ингибитором — НАДН при различных концентрациях субстрата [64].

Концентрация изоцитрата 0,9 мм (1) и 2,1 мм (2); 10 мм фосфат калия; 25 мм глицилглицин, рН 7,7; 10 мм $MgCl_2$; 0,67 мм НАД.

связывающие центры и, следовательно, угнетает ферментативную активность; однако, с другой стороны, связывание НАДФН на одном из центров приводит к увеличению сродства второго центра к коферменту, что обуславливает увеличение ферментативной активности. В результате наблюдается активация аналогом кофермента в области малых кон-

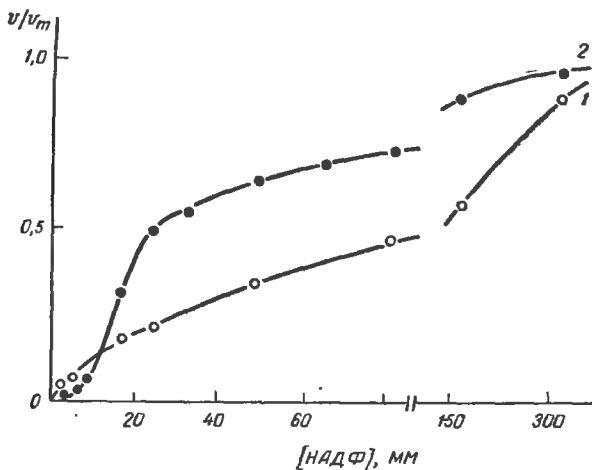


Рис. 31. Зависимость скорости реакции, катализируемой глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой из эритроцитов человека, от концентрации кофермента — НАДФ в отсутствие (1) и в присутствии (2) НАДФН (80 мМ) [49].

Трис-бонат, рН 8,0; 4 мМ глюкозо-6-фосфат.

центраций кофермента и ингибирование в области больших. НАД-зависимые изоцитратдегидрогеназы из дрожжей [65], митохондрий гороха [66] и митохондрий клубней картофеля [67] активируются малыми концентрациями аналога субстрата — цитрата при малых концентрациях изоцитрата. При больших концентрациях субстрата цитрат выступает в роли конкурентного ингибитора по отношению к изоцитрату. При этом в присутствии цитрата исчезает кооперативность по субстрату (рис. 32).

Ингибирование избытком субстрата или кофермента также может иметь аллостерическую природу. Один из примеров приведен выше — ингибирование обратной реакции, катализируемой малатдегидрогеназой, избытком НАДН [32].

К кинетическим проявлениям аллостерических взаимодействий следует отнести и явление синергизма в действии аллостерических ингибиторов. Stein и др. показали, например, что НАДФН усиливает ингибирующее действие НАДН по отношению к НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназе из митохондрий млекопитающих [64]. На основании флуо-

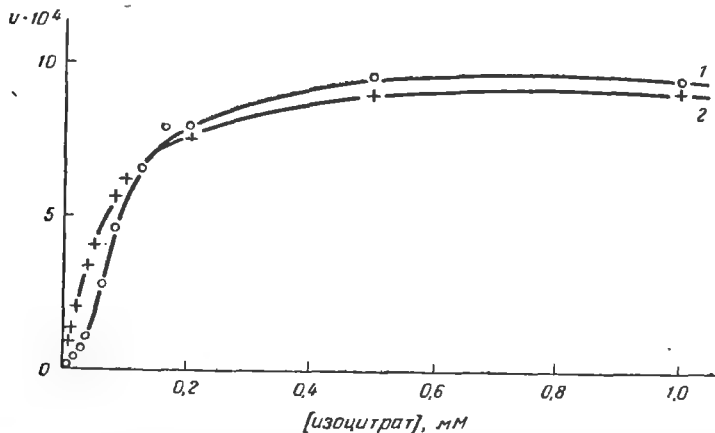


Рис. 32. Влияние цитрата (1 мМ) на зависимость скорости реакции, катализируемой НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназой из митохондрий гороха, от концентрации субстрата — изоцитрата [65].

1 — в отсутствие цитрата, 2 — в присутствии 1 мМ цитрата (0,05 М N-2-оксисетиллиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота, pH 7,6; 25°). Размерность, v — единица оптической плотности в секунду.

риметрического изучения комплексов изоцитратдегидрогеназы с НАДН и НАДФН Harvey и др. пришли к заключению, что НАДН и НАДФН связываются на различных центрах белковой молекулы [68]. Magg, Weber обнаружили синергизм в совместном действии глиоксалата и оксалоацетата на активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы из *Crithidia fasciculata* [69]. Ингибирующее действие каждого из этих соединений является незначительным, однако оно существенно усиливается в том случае, когда глиоксаль и оксалоацетат присутствуют одновременно. На рис. 33 представлены кривые зависимости относительной активности (v_i/v_0) изоцитратдегидрогеназы от логарифма концентрации глиоксалата при трех фиксированных концентрациях оксалоацетата: $1,7 \cdot 10^{-5}$; $1,7 \cdot 10^{-4}$ и $1,7 \cdot 10^{-3}$ М. Оксалоацетат в этих концентрациях снижает активность изоцитратдегидрогеназы на 0; 0 и 31% соответственно. Из

рисунка видно, что с увеличением концентрации оксалоацетата ингибирующая способность глиоксалата существенно увеличивается. Синергизм в совместном действии двух ингибиторов возможен лишь в том случае, когда оба ингибитора связываются на различных центрах белковой молекулы.

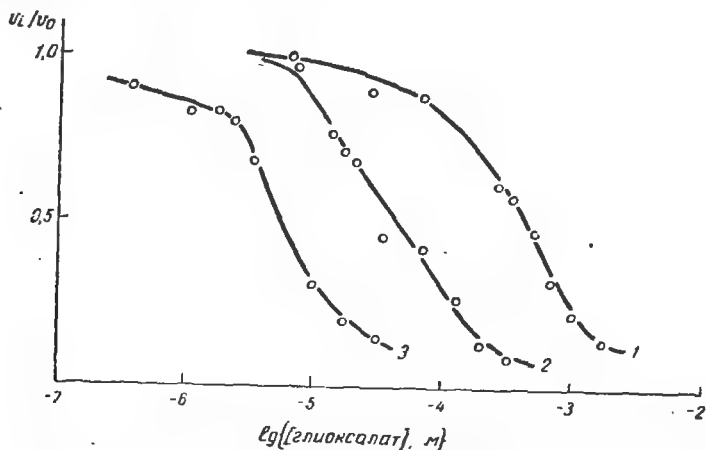


Рис. 33. Влияние оксалоацетата на ингибирование НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы из *Crithidia fasciculata* глиоксальтом [69].

v_0 и v_i — скорости ферментативной реакции в отсутствие и в присутствии глиоксалата соответственно. Измерения скоростей проведены при фиксированных концентрациях оксалоацетата $1,7 \cdot 10^{-5}$ М (1); $1,7 \cdot 10^{-4}$ М (2) и $1,7 \cdot 10^{-3}$ М (3); 0,17 М трис-НCl буфер, pH 7,7; 0,07 мМ $MnCl_2$; 0,1 мМ НАДФ; 0,07 мМ D, L-изоцитрат.

Как отмечалось выше, аллостерическими называют взаимодействия пространственно разделенных центров в белковой молекуле. Поэтому если вещество называют аллостерическим эффектором, то должны быть представлены доказательства того, что оно связывается на отдельном центре, пространственно удаленном от активного. Такие доказательства могут быть получены десенсибилизацией регуляторного фермента. Десенсибилизация — это потеря чувствительности фермента к действию аллостерических эффекторов, которая может быть достигнута нагреванием, химическим модифицированием, действием мочевины, органических растворителей, облучения и т. д. Например, рассмотренная выше малатдегидрогеназа (декарбоксилирующая) десенсибилизируется к своим аллостерическим инги-

биторам — оксалоацетату, ацетил-КоА и НАДН в присутствии 0,72 М глицина [31]. Регуляторный фермент — глутаматдегидрогеназа десенсибилизируется фтординитробензолом по отношению к аллостерическим эффекторам, АДФ-активатору и ГТФ-ингибитору [70]. Если обрабатывать глутаматдегидрогеназу модифицирующим агентом в присутствии НАД, закрывающего активный центр, то активность фермента падает лишь в незначительной степени (средняя кривая на рис. 34). В то же время в ходе обработки теряется способность фермента активироваться АДФ и ингибироваться ГТФ. Это видно из верхней и нижней кривых, для которых активность определялась в присутствии АДФ и ГТФ соответственно. Потеря чувствительности глутаматдегидрогеназы к АДФ и ГТФ обусловлена разрушением центров, связывающих эти эффекторы.

Аллостерические взаимодействия представляют собой не прямые взаимодействия, которые опосредуются конформационными изменениями белковой молекулы. Изменения структуры молекулы белка при связывании субстратов или аллостерических эффекторов могут быть зафиксированы различными физическими методами.

В последнее время для этой цели широко используются различного рода метки: флуоресцентные, свободнорадикальные и др. [71—75]. Первым указанием на изменение структуры белка при связывании аллостерических эффекторов послужили данные по изменению степени диссоциации — ассоциации регуляторных ферментов под действием аллостерических эффекторов [76, 77]. По-видимому, изменение прочности связей между субъединицами в ферментативном олигомере является очень чувствительным тестом на конформационные изменения белковой молекулы при связывании аллостерических эффекторов. Обнаружено, например, что

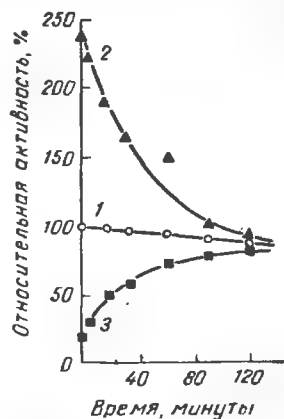


Рис. 34. Десенсибилизация глутаматдегидрогеназы из печени быка при обработке фтординитробензолом [72].

Обработку фтординитробензолом проводили в 0,05 М фосфатном буфере, pH 8,0 при 32° в присутствии 1 мМ НАД, а определение активности — в 0,05 М трис-HCl буфере, pH 9,0 с 8,3 мМ глутаматом и 0,05 мМ НАД в отсутствие эффекторов (1), в присутствии 0,5 мМ АДФ (2) или 0,02 мМ ГТФ (3).

аллостерические ингибиторы — ГДФ и ГТФ уменьшают степень диссоциации глутаматдегидрогеназы из печени быка, в то время как аллостерической активатор — АДФ увеличивает степень диссоциации [78—80]. Аллостерический активатор — АДФ стабилизирует более агрегированную форму НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы из сердца быка [81, 71].

Изменения размеров молекулы цитрат-синтазы из *Acinetobacter lwoffii* при связывании аллостерического ингибитора — НАДН были обнаружены с помощью электронной микроскопии [82].

Предложен ряд моделей регуляторных механизмов, позволяющих количественно описать взаимодействия лигандов, связывающихся на пространственно разделенных центрах ферментов. Наиболее разработанными из них являются модель Monod, Wyman, Changeux, предложенная в 1965 г. [83], и модель Koshland, Nemethy, Filmer, предложенная в 1966 г. [84]. Модель Monod и др. постулирует, что аллостерический фермент представляет собой симметричный олигомер, построенный из идентичных субъединиц (протомеров). Предполагается, что при аллостерическом переходе все протомеры одновременно меняют свою конформацию, так что симметрия олигомера сохраняется. В этой модели аллостерические взаимодействия опосредуются смещением равновесия между, по меньшей мере, двумя конформационными состояниями ($R \rightleftharpoons T$) под действием субстратов или аллостерических эффекторов. Привлекательность модели Monod объясняется ее относительной простотой и тем, что она предсказывает определенный характер влияния эффекторов на кооперативность связывания субстрата и влияния субстрата на кооперативность связывания эффекторов. Отмеченное выше уменьшение кооперативности по изоцитрату в присутствии положительного эффектора — АДФ и увеличение кооперативности в присутствии отрицательного эффектора — НАДН, а также уменьшение кооперативности по НАДН при снижении концентрации субстрата для регуляторного фермента — НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы согласуются с качественными предсказаниями модели Monod и др. Модель Koshland и др. является более сложной и учитывает возникновение промежуточных несимметричных состояний, в которых конформации протомеров неодинаковы.

Модель Monod и др. была количественно использована Kirschner и Eigen при описании кооперативного связы-

вания НАД дрожжевой *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой (КФ 1. 2. 1. 12) [85—87]. Функция насыщения имеет S-образный характер, отражающий кооперативное взаимодействие центров, связывающих НАД (рис. 35). Изучая кинетику связывания НАД при помощи метода температурного скачка, авторы показали, что процесс релаксации характеризуется тремя временными константами: $1/\tau_1$ —7000 сек.⁻¹, $1/\tau_2$ —690 сек.⁻¹ и $1/\tau_3$ —0,2 сек.⁻¹. Величины $1/\tau_1$ и $1/\tau_2$ растут с увеличением концентрации НАД. Величина $1/\tau_3$ снижается с ростом концентрации НАД, но в то же время не зависит от концентрации фермента в интервале концентраций последнего от 0,25 до 25 мг/мл. Это указывает на то, что третья, наиболее медленная стадия процесса релаксации представляет собой изомеризацию фермента ($R \rightleftharpoons T$). Времена релаксации τ_1 и τ_2 соответствуют стадиям присоединения НАД к 2

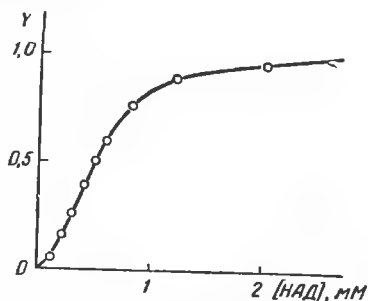


Рис. 35. Связывание НАД дрожжевой *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой, прослеженное спектрофотометрическим методом (рН 8,5; 40°) [85]; Y — степень насыщения.

формам фермента. Константа изомеризации L ($L=[T]/[R]$) составляет ~ 30 , а отношение констант диссоциации комплексов НАД с формами R и T — 0,3 (рН 8,5; 40°).

На рис. 36 точки представляют собой экспериментальные данные, а сплошная кривая — функцию насыщения, рассчитанную в соответствии с моделью.

Интересно, что при связывании НАД *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой из мышц кролика наблюдается обратная картина: связывание первых молекул НАД приводит к уменьшению сродства незанятых центров [88—90].

На рис. 36 представлены данные [88] по связыванию НАД в координатах Y/C от Y , где Y — степень насыщения, а C — равновесная концентрация лиганда. Характер кривой указывает на наличие отрицательных взаимодействий между центрами, связывающими НАД, для объяснения которых была использована модель Koshland и др.

К аналогичному выводу относительно характера взаимодействия центров, связывающих НАД, в молекулах мышеч-

ной и дрожжевой *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы пришли Eisele, Wallenfels [91, 92] на основании изучения изменения стереоселективности взаимодействия фермента с *D*-(+)- и *L*-(-)- α -йодпропионовой кислотами и их амидами при добавлении к ферменту НАД.

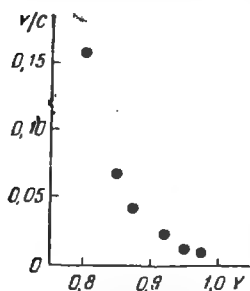
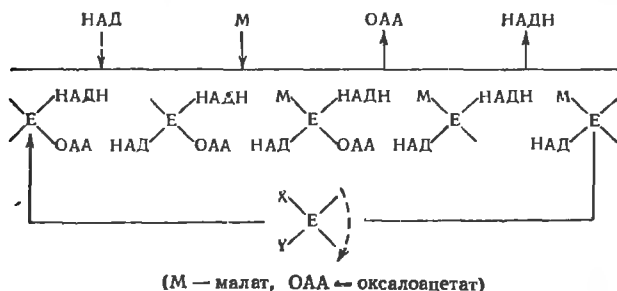


Рис. 36. Связывание НАД *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой из мышц кролика [88].

Y — степень насыщения, C — равновесная концентрация НАД, 0.05 M — фосфатный буфер, pH 8.5; 3°; концентрация фермента $2 \cdot 10^{-6}$ M.

Интересный механизм взаимодействия активных центров в молекуле малатдегидрогеназы из митохондрий сердца свиньи был предложен в работе [93]. Авторы обнаружили уменьшение максимальной скорости реакции при замене оксалоацетата неприродным субстратом — кетомалатом. Этот результат является неожиданным, поскольку лимитирующей стадией ферментативного процесса является стадия отщепления НАД из двойного комплекса. Для объяснения этого противоречия авторы предложили следующий механизм, который был назван ими «механизмом с возвратно-поступательным принудительным порядком связывания субстратов» (reciprocating compulsory order mechanism).



Предполагается, что два эквивалентных центра в молекуле фермента взаимодействуют таким образом, что химическая трансформация на одном центре происходит лишь в том случае, когда второй центр свободен, а отщепление продуктов — лишь после того, как другой центр занимает субстратом и коферментом. Silverstein и Sulebele [20] считают, однако, что полученные ими данные по изучению

скоростей взаимного превращения $\text{НАД} \rightleftharpoons \text{НАДН}$ и малат $\rightleftharpoons$ оксалоацетат с помощью изотопной метки не согласуются с механизмом, предложенным в работе [93].

До сих пор речь шла о моделях аллостерической регуляции активности ферментов, в которых ферментативный олигомер считается недиссоциирующим. Однако регуляторные ферменты способны в определенных условиях диссоциировать на отдельные субъединицы, причем степень диссоциации, как правило, зависит от присутствия субстратов и аллостерических эффекторов. Это свойство регуляторных ферментов позволяет предложить модель, в которой аллостерические взаимодействия опосредуются смещением равновесия между олигомерными формами фермента под действием субстрата или эффекторов. Подобные представления были впервые развиты в 1967 г. в работах Б. И. Курганова [94, 77, 95], американского ученого Frieden [96, 97] и австралийских ученых [98]. Принципиальное отличие работ Б. И. Курганова от этих работ состоит в том, что в них изложены принципы анализа диссоциирующих ферментативных систем, позволяющие выделить кинетические эффекты, связанные с изменением степени диссоциации ферментативного олигомера под действием субстрата и аллостерических эффекторов. Кинетическое поведение регуляторного фермента, для которого аллостерические взаимодействия опосредуются смещением равновесия между олигомерными формами фермента, должно зависеть от концентрации фермента.

Frieden, Colman показали, что форма функции насыщения глутаматдегидрогеназы из печени быка аллостерическим ингибитором — ГТФ зависит от концентрации фермента [78]. Функции насыщения являются S-образными, причем степень насыщения растет с уменьшением концентрации фермента (рис. 37). Параллельные измерения молекулярных весов показали, что кооперативный характер связывания ГТФ обусловлен смещением равновесия между олигомерными формами глутаматдегидрогеназы в сторону образования мономерной формы с молекулярным весом около 400 000* под действием ГТФ, т. е. уменьшением степени ассоциации фермента. В работе [100] было установлено, что степень ингибирования глутаматдегидрогеназы из печени быка аллостерическими ингибиторами — эстрадиолом

* По данным работ [79 и 99], молекулярный вес мономерной формы глутаматдегидрогеназы составляет 313 000 и 280 000 соответственно.

и ГДФ — заметно снижается при увеличении концентрации фермента.

Mankovitz, Segal обнаружили, что гомосериндегидрогеназа из *Rhodospirillum rubrum* десенсибилизируется по отношению к аллостерическому ингибитору — треонину и аллостерическим активаторам — метионину и изолейцину при

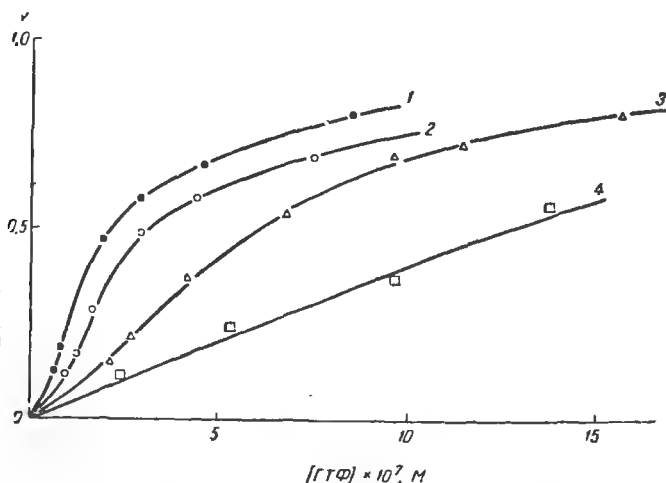


Рис. 37. Функции насыщения глутаматдегидрогеназы из печени быка аллостерическим ингибитором — ГДФ при различных концентрациях фермента.

Функции насыщения рассчитаны на основании данных работы [78]. Концентрация глутаматдегидрогеназы: 0,12 мг/мл (1); 0,5 мг/мл (2); 2,0 мг/мл (3) и 14,7 мг/мл (4). 0,1 М трис-ацетатный буфер, pH 7,1; 1 мМ фосфат; 0,1 ЭДТА; 0,4 мМ НАДН; 5°.

разбавлении раствора фермента [101, 102]. Как видно из рис. 38, десенсибилизация протекает за 10—20 минут. Предполагается, что десенсибилизация связана с диссоциацией гомосериндегидрогеназы, приводящей к образованию олигомерных форм, не чувствительных к аллостерическим эффекторам. Из данных, представленных на рис. 38, видно также, что в том случае, когда равновесие между олигомерными формами фермента устанавливается медленно в сравнении со скоростью ферментативной реакции, кинетическое поведение фермента зависит не только от его концентрации, но и от времени предварительной инкубации фермента в разбавленном состоянии. Заметим, что при сравнимых скоростях обоих процессов могут наблюдаться отклонения от стационарности для ферментативного процесса.

Смещение равновесия между олигомерными формами фермента, обладающими различной ферментативной активностью (под действием субстратов, аллостерических эффекторов, pH и т. д.), может служить фактором, регулирующим активность фермента в живой клетке. Lé John и др. [41] показали, например, что НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа из *Blastocladiella emersonii* может находиться в активной мономерной форме (с молекулярным весом 110 000) и неактивных полимерных формах (с молекулярным весом 200 000—500 000). Изоцитрат, цитрат, Mn^{2+} , Mg^{2+} и изменение pH от 6,5 до 7,5 благоприятствуют образованию активного мономера. Предполагается, что цитрат и ионы водорода могут регулировать активность изоцитратдегидрогеназы в клетке организма, воздействуя на олигомерное состояние фермента. Цитрат вызывает дезагрегацию и изоцитратдегидрогеназы из митохондрий гороха [103].

Vonsignore и др. показали, что глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа из эритроцитов человека инактивируется субстратом — глюкозо-6-фосфатом и коферментом — НАДФН, вызывающими диссоциацию фермента на неактивные субъединицы [104]. Напротив, НАДФ препятствует диссоциации, стабилизируя активную форму с большим молекулярным весом. В случае дрожжевой глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы НАДФ также вызывает ассоциацию апофермента [105].

В работе [106] было показано, что АТФ вызывает диссоциацию тетрамера D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из скелетных мышц кролика на димеры и мономеры с одновременной потерей ферментативной активности. НАД препятствует диссоциации тетрамера (см. также [107]).

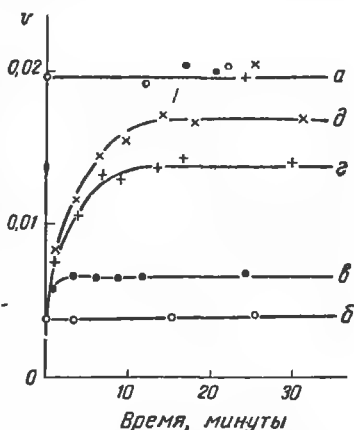


Рис. 38. Десенсибилизация гомосериндегидрогеназы из *Rhodospirillum rubrum* к аллостерическому ингибитору — треонину при разбавлении раствора фермента [101].

30 мМ фосфатный буфер, pH 7,2; 1 мМ K_2EDTA ; 0,1 М KCl ; $\mu=0,175$; 15 мкМ НАДФ, 58 мкМ β -полуальдегид аспарагиновой кислоты; 23°. Активность определялась в отсутствие треоина (а), в присутствии треоина (б—д). Степень разбавления фермента: о—0, .—10, +—100 и $\times$ —1000 раз.

Возможно, что АТФ регулирует уровень активности *D*-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в живой клетке.

Из вышеизложенного ясно, что аллостерические взаимодействия можно разбить на две большие группы: 1) аллостерические взаимодействия в недиссоциирующем ферментативном олигомере и 2) аллостерические взаимодействия, опосредованные изменением степени диссоциации ферментативного олигомера под действием субстрата или эффекторов. Следует подчеркнуть, что эти типы взаимодействий не исключают друг друга, и, возможно, в определенных случаях мы сталкиваемся сразу с обоими типами взаимодействий.

Изучение кинетического поведения регуляторного фермента при различных его концентрациях позволяет выделить кинетические эффекты, связанные со смещением равновесия между олигомерными формами фермента под действием субстрата и аллостерических эффекторов [77]. Благодаря этому становится возможным раздельное изучение аллостерических взаимодействий в отдельных олигомерных формах фермента и аллостерических взаимодействий, опосредованных изменением степени диссоциации ферментативного олигомера. При изучении взаимодействий первого типа целесообразно первоначально проверить выполнимость наиболее простой модели — модели Monod с соавторами. Такая проверка может быть проведена на основе анализа кривых зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации аллостерического эффектора, полученных при различных концентрациях субстрата (или других эффекторов). Как уже отмечалось выше, в модели Monod и др. аллостерические взаимодействия опосредуются смещением равновесия между двумя состояниями ферментативного олигомера ($R \rightleftharpoons T$), в каждом из которых активные и аллостерические центры являются эквивалентными и не взаимодействующими под действием субстрата и аллостерических эффекторов. Удельная ферментативная активность фермента a (т. е. отношение начальной скорости ферментативной реакции к концентрации фермента), удовлетворяющего модели Monod и др., связана с удельными ферментативными активностями форм R и T (a_R и a_T соответственно) следующим образом:

$$a = a_R - (a_R - a_T) \frac{K_{AL}}{1 + K_{AL}}, \quad (14)$$

где K_{AL} — кажущаяся «аллостерическая» константа, характеризующая

положение равновесия $R \rightleftharpoons T$. Константа K_{AL} зависит от концентраций субстрата $[S]_0$ и эффектора $[F]_0$ следующим образом:

$$K_{AL} = K_{o,AL} \left(\frac{1 + [S]_0/K_{mT}}{1 + [S]_0/K_{mR}} \right)^n \left(\frac{1 + [F]_0/K_{FT}}{1 + [F]_0/K_{FR}} \right)^n \quad (15)$$

где $K_{o,AL}$ — «аллостерическая» константа в отсутствие субстрата и эффектора ($K_{o,AL} = [T]/[R]$), K_{mR} и K_{mT} — микроскопические константы Михаэлиса для форм R и T соответственно, K_{FR} и K_{FT} — микроскопические константы диссоциации комплексов эффектора с формами R и T соответственно, n — число активных и соответственно аллостерических центров в ферментативном олигомере.

Анализируя уравнение (13), можно показать, что

$$n_H = - \frac{\partial \left\{ \frac{1}{a_0 - a} \right\}}{\partial \frac{1}{(a_0 - a)}} = - \frac{2[F]_0}{(a_0 - a)} \cdot \frac{\partial a}{\partial [F]_0} - [F]_0 \cdot \frac{\left(\frac{\partial^2 a}{\partial [F]_0^2} \right)}{\left(\frac{\partial a}{\partial [F]_0} \right)} - 1. \quad (16)$$

Используя это выражение, можно получить зависимость n_H от концентрации эффектора для модели Monod и др.:

$$n_H = \frac{f_0}{(1 + f_0)(1 + \delta f_0)} \left[1 + \delta(1 + 2f_0) + n(\delta - 1) \frac{\left\{ \left(\frac{1 + \delta f_0}{1 + f_0} \right)^n + 1 \right\}}{\left\{ \left(\frac{1 + \delta f_0}{1 + f_0} \right)^n - 1 \right\}} \right] - 1, \quad (17)$$

где $f_0 = [F]_0/K_{FR}$ и $\delta = K_{FR}/K_{FT}$. При $[F]_0 \rightarrow 0$ n_H стремится к 1. С увеличением концентраций эффектора n растет, достигает максимального значения и уменьшения до 1 при дальнейшем увеличении $[F]_0$.

Из выражения (17) видно, что вид зависимости n_H от $[F]_0$ определяется только величиной δ (при заданном n) и не зависит от концентрации субстрата и величины константы $K_{o,AL}$, т. е. от положения равновесия $R \rightleftharpoons T$. Следовательно, в случае выполнимости модели Monod и др. зависимость n_H от $[F]_0$ должна иметь один и тот же вид при любых фиксированных концентрациях субстрата и других аллостерических эффекторов. Заметим, что из экспериментальных данных зависимость n_H от $[F]_0$ может быть рассчитана с помощью следующего выражения [108]:

$$n_H = \lg \left\{ \left(\frac{1}{v_0 - v'} - \frac{1}{v_0 - v} \right) / \left(\frac{1}{v_0 - v} - \frac{1}{v_0 - v''} \right) \right\} / \lg x, \quad (18)$$

где v , v' и v'' — значения скорости ферментативной реакции при концентрациях эффектора, равных соответственно $[F]_0$, $[F]_0 x$ и $x[F]_0$ (x — постоянный множитель).

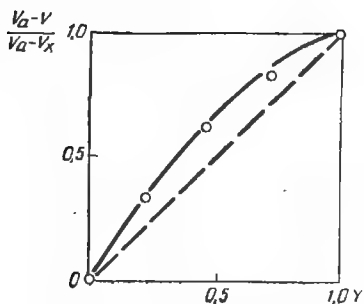


Рис. 39. Зависимость степени конформационных изменений $(V_a - V)/(V_a - V_x)$ от степени насыщения дрожжевой D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы НАД (Y) (pH 8,5; 40°) [100].

$V_a - V_x$ — объем молекулы фермента при степенях насыщения 0,0 и 0,99, V — объем молекулы при промежуточных степенях насыщения. Точки — экспериментальные данные, сплошная кривая проведена в соответствии с моделью Мона с сотрудниками при $n=4$, $K_R=0,1$ мМ, $K_T=2,5$ мМ и $K_{OAL}=60$. Пунктирная линия (диагональ квадрата) соответствует случаю, когда взаимодействие центров отсутствует.

Таким образом, кинетические методы позволяют обнаружить аллостерические взаимодействия в диссоциирующих ферментативных системах и проверить выполнимость модели Monod, Wyman, Changeux. Заметим, что, по мнению Teipel и Koshland [46], кривые зависимости v от $[S]_0$ с двумя точками перегиба свидетельствуют о выполнимости в подобных случаях модели, развиваемой Koshland. Однако этот критерий не позволяет однозначно выбрать модель регуляторного фермента, поскольку, как было показано ранее Б. И. Кургановым, для диссоциирующего регуляторного фермента при определенных значениях кинетических параметров зависимость v от $[S]_0$ также может иметь две точки перегиба [77].

Следует отметить, что параллельное изучение зависимости скорости ферментативной реакции (или степени насыщения) и степени конформационных изменений от концентрации субстрата (или эффектора) позволяет, по-видимому, более надежно выбрать модель регуляторного фермента [109]. Подобный подход был использован, например, в работе Durchslag и др. при изучении кооперативного связывания НАД дрожжевой D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой [110]. С помощью метода рассеяния рентгеновых лучей под малыми углами было показано, что переход от апо- к холоферменту сопровождается уменьшением объема молекулы на 7,08%. На рис. 39 представлена полученная авторами зависимость $(V_a - V)/(V_a - V_x)$ (где V_a и V_x — объем молекулы фермента при степенях насыщения коферментом 0,0 и 0,99 соответственно, а V — объем молекулы при промежуточных степенях насыщения), которая характеризует степень конформационных изменений от

степени насыщения фермента коферментом (Y). Как видно из рис. 39, конформационные изменения «обгоняют» степень насыщения. Авторы показали, что экспериментально полученная зависимость $(V_a - V)/(V_a - V_x)$ от Y может быть описана моделью Monod и др. при следующих значениях параметров: $n=4$, $K_R=0,1$ мМ, $K_T=2,5$ мМ и $K_{0,AL}=60$.

В заключение следует подчеркнуть, что регуляторная функция никотинамидадениннуклеотидов является не менее важной, чем коферментная. Регуляторные функции коферментов других классов изучены в меньшей степени, но есть основания полагать, что эти коферменты также могут выступать в роли регуляторов ферментативных процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stadtman E. Adv. Enzym., 1966, 28, 41.
2. Atkinson D. Ann. Rev. Biochem., 1966, 35, 85.
3. Cleland W. Biochim. Biophys. Acta, 1963, 67, 104, 173, 188.
4. Theorell H., Chance B. Acta Chem. Scand., 1951, 5, 1127.
5. Dalziel K. Acta Chem. Scand., 1957, 11, 1706.
6. Theorell H. The Harvey Lectures, Ser. 61, Acad. Press, 1967, 17.
7. Alberty R. J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 1777.
8. Fromm H., Nelson D. J. Biol. Chem., 1962, 237, 215.
9. Heyde E., Ainsworth S. J. Biol. Chem., 1968, 243, 2413.
10. Zewe V., Fromm H. J. Biol. Chem., 1962, 237, 1668.
11. Zewe V., Fromm H. Biochemistry, 1965, 4, 782.
12. Frieden C. J. Biol. Chem., 1953, 234, 2891.
13. Nygaard A., Theorell H. Acta Chem. Scand., 1955, 9, 1300.
14. Palm D. Europ. J. Biochem., 1968, 5, 270.
15. Boyer P. Arch. Biochem. Biophys., 1959, 82, 387.
16. Boyer P., Silverstein E. Acta Chem. Scand., 1963, 17, Suppl. 1, 195.
17. Silverstein E., Boyer P. J. Biol. Chem., 1964, 239, 3901.
18. Cleland W. Ann. Rev. Biochem., 1967, 36, 89.
19. Yagil G., Hoberman H. Biochemistry, 1969, 8, 352.
20. Silverstein E., Sulebele G. Biochemistry, 1969, 8, 2543.
21. Hammes G. Adv. Prot. Chem., 1968, 23, 1.
22. Kirschner K. FEBS Letters, 1969, 3, 161.
23. Gutfreund H., Cantwell R., McMurray C., Criddle R., Hathaway G. Biochem. J., 1968, 106, 683.
24. Heck H., McMurray C., Gutfreund H. Biochem. J., 1968, 108, 793.
25. Gutfreund H. В кн.: Nobel Symposium S. Fast reactions and primary processes in chemical kinetics. Interscience Publishers, 1967, 429.
26. Criddle R., McMurray C., Gutfreund H. Nature, 1968, 220, 1091.
27. Weitzman P. Biochim. Biophys. Acta, 1967, 139, 526.
28. Weitzman P., Jones D. Nature, 1968, 219, 270.
29. Weitzman P., Dunmore P. Biochim. Biophys. Acta, 1969, 171, 198.
30. Sanwal B., Smando R. J. Biol. Chem., 1969, 244, 1817.
31. Sanwal B., Smando R. J. Biol. Chem., 1969, 244, 1824.
32. Sanwal B. J. Biol. Chem., 1969, 244, 1831.
33. Wright J., Sanwal B. J. Biol. Chem., 1969, 244, 1838.
34. Cazzulo J., Stoppani A. Biochem. J., 1969, 112, 755.

35. Suzuki T. Biochim. Biophys. Acta, 1969, 191, 559.
36. Weber G., Singhal R., Stamm N., Srivastava S. Fed. Proc., 1965, 24, 745.
37. Kapoor M., Bray D. Biochemistry, 1968, 7, 3583.
38. MacElroy R., Johnson E., Johnson M. Archiv. Biochem. Biophys., 1969, 131, 272.
39. Rindt K., Ohmann E. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1969, 36, 357.
40. Genter N., Greenberg E., Preiss J. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1969, 36, 373.
41. Le John H., McCrea B., Suzuki I., Jackson S. J. Biol. Chem., 1969, 244, 2484.
42. Dennis D., Coultate T. Life sciences, 1967, 6, 2353.
43. Dalziel K., Engel P. FEBS Letters, 1968, 1, 349.
44. Le John H., Jackson S. J. Biol. Chem., 1968, 243, 3447.
45. Magar M., Homi M. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1968, 31, 665.
46. Teipel J., Koshland D. Biochemistry, 1969, 8, 4656.
47. Slaughter J., Davies D. Biochem. J., 1968, 109, 749.
48. Sugimoto E., Pizer L. J. Biol. Chem., 1968, 243, 2081, 2090.
49. Kito M., Pizer L. J. Biol. Chem., 1969, 244, 3316.
50. Luzzatto L. Biochim. Biophys. Acta, 1967, 146, 18.
51. Blackkolb F., Schlegel H. Archiv. Mikrobiol., 1968, 63, 177.
52. Мильман Л. С., Юровицкий Ю. Г. ДАН СССР, 1968, 179, 472.
53. Pourquie J. Biochim. Biophys. Acta, 1969, 185, 310.
54. Buzzer D., Levin A. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1968, 30, 673.
55. Takeo K., Murai T., Nagai J., Katsuki H. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1967, 29, 717.
56. Sanwal B., Smando R. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1969, 35, 486.
57. London J., Meyer E. Biochim. Biophys. Acta, 1969, 178, 205.
58. D'Auzac J., Jacob J. Compt. rend., 1967, 264, Ser. D, 2007.
59. Jacob J., D'Auzac J. Compt. rend., 1968, 266, Ser. D, 631.
60. Kaloustian H., Kaplan N. J. Biol. Chem., 1969, 244, 2902.
61. Bittenberger C., Fulco J. J. Biol. Chem., 1967, 242, 2917.
62. Tarmy E., Kaplan N. J. Biol. Chem., 1968, 243, 2587.
63. Sanwal B., Wright J., Smando R. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1968, 31, 623.
64. Stein A., Kirkman S., Stein J. Biochemistry, 1967, 6, 3197.
65. Atkinson D., Hathaway J., Smith E. J. Biol. Chem., 1965, 240, 2682.
66. Cox G., Davies D. Biochem. J., 1967, 105, 729.
67. Ribéreau-Gayon G., Laties G. Compt. rend., 1969, 268, Ser. D, 2612.
68. Harvey R., Giorgio N., Plaut G. Fed. Proc., 1969, 28, 858 (N3357).
69. Marr J., Weber M. J. Biol. Chem., 1969, 244, 5709.
70. Prisco G., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1967, 26, 148.
71. Гамильтон К. Л., Макконнелл Г. М. Успехи химии, 1970, 39, 531.
72. Лихтенштейн Г. И., Бободжанов П. Х., Розанцев Э. Г., Сускина В. И. Мол. биол., 1968, 2, 344.
73. McConnell H., Deal W., Ogata R. Biochemistry, 1969, 8, 2580.
74. Thompson W., Yielding K. Archiv. Biochem. Biophys., 1968, 126, 399.
75. Dodd G., Radda G. Biochem. J., 1969, 114, 407.
76. Monod J., Changeux J., Jacob F. J. Mol. Biol., 1963, 6, 306.
77. Курганов Б. И. Мол. биол., 1968, 2, 430.

78. *Frieden C., Colman R. J.* Biol. Chem., 1967, **242**, 1705.
79. *Eisenberg H., Tomkins G. J.* Mol. Biol., 1968, **31**, 37.
80. *Huang C., Frieden C.* Fed. Proc., 1969, **28**, 536 (N 1537).
81. *Chen R., Brown D., Plant G.* Biochemistry, 1964, **3**, 552.
82. *Rowe A., Weitzman P. J.* Mol. Biol., 1969, **43**, 345.
83. *Monod J., Wyman J., Changeux J. J.* Mol. Biol., 1965, **12**, 88.
84. *Koshland D., Némethy G., Filmer D.* Biochemistry, 1966, **5**, 365.
85. *Kirschner K., Eigen M., Bittman R., Voigt B.* Proc. Natl. Acad. Sci., 1966, **56**, 1661.
86. *Eigen M.* Quart. Rev. Biophys., 1968, **1**, 3.
87. *Kirschner K.* Abstr. 6th Meet. FEBS. Madrid, 1969, N 393.
88. *Conway A., Koshland D.* Biochemistry, 1968, **7**, 4011.
89. *Koshland D., Conway A., Kirtley M.* В кн.: The regulation of enzyme activity and allosteric interactions. Universitetsforlaget. Oslo, 1968, 131.
90. *De Vijlder J., Slater E.* Biochim. Biophys., Acta, 1968, **167**, 23.
91. *Eisele B., Wallenfels K.* FEBS Letters, 1968, **1**, 25.
92. *Eisele B., Wallenfels K.* Abstr. 6th Meet. FEBS. Madrid, 1969, N 185.
93. *Harada K., Wolfe R. J.* Biol. Chem., 1968, **243**, 4131.
94. *Курганов Б. И.* Химия и технология полимеров. 1967, **11**, 140.
95. *Курганов Б. И.* Мол. биол., 1968, **2**, 166, 180.
96. *Frieden C. J.* Biol. Chem., 1967, **242**, 4045.
97. *Frieden C.* В кн.: The regulation of enzyme activity and allosteric interactions. Universitetsforlaget. Oslo, 1968, 59.
98. *Nichol L., Jackson W., Winzor D.* Biochemistry, 1967, **6**, 2449.
99. *Sund H., Burchard W.* Europ. J. Biochem., 1968, **6**, 202.
100. *Spivey H.* Fed. Proc. **28**, 342 (N471), 1969.
101. *Mankovitz R., Segal H.* FEBS Letters, 1969, **3**, 44.
102. *Mankovitz R., Segal H.* Biochemistry, 1969, **8**, 3757, 3765.
103. *Cox G., Davies D.* Biochem. J., 1969, **111**, 813.
104. *Bonsignore A. et al.* Ital. J. Biochem., 1968, **17**, 90.
105. *Yue R., Nollmann E., Kuby S. J.* Biol. Chem., 1969, **244**, 1353.
106. *Constantinides S., Deal W. J.* Biol. Chem., 1969, **244**, 5695.
107. *Hoagland V., Teller D.* Biochemistry, 1968, **8**, 594.
108. *Силонова Г. В., Ливанова Н. Б., Курганов Б. И.* Мол. биол., 1969, **3**, 768.
109. *Haber J., Koshland D.* Proc. Nat. Acad. Sci., 1967, **58**, 2087.
110. *Durchslag H., Puchwein G., Kratky O., Schuster I., Kirschner K.* FEBS Letters, 1969, **4**, 75.

ХИМИЯ УБИХИНОНОВ

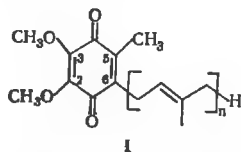
Е. А. ОБОЛЬНИКОВА

Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва

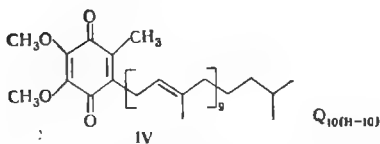
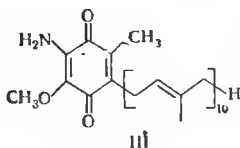
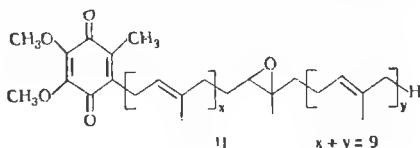
Убихиноны (кофермент Q)¹ представляют собой 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохиноны с различной полипренильной цепочкой в 6-м положении.

¹ На основании рекомендаций Комиссии по биохимической номенклатуре Международного союза теоретической и прикладной химии и Международного биохимического союза убихиноны обозначают Q_n, где n — число изопреноидных звеньев в боковой цепи [1].

Открыты убихиноны около 14 лет назад независимо друг от друга английскими, американскими и швейцарскими исследователями. Строение выделенных первоначально пяти высших представителей этой группы природных соединений ($I, n=6-10$) подтверждено методом ядерно-магнитного резонанса, окислительным расщеплением и встречным синтезом [2-6].



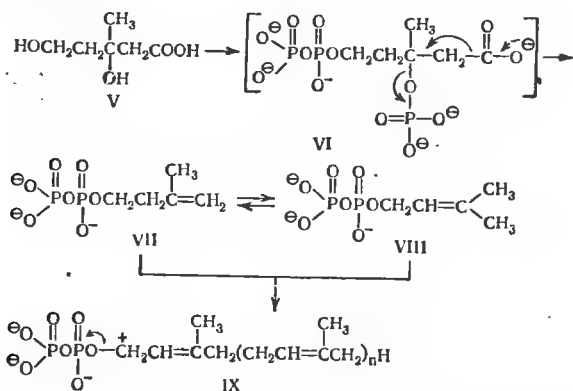
В настоящее время в природе найдены убихиноны Q_1-Q_4 [7], Q_5 [8], Q_{11} и Q_{12} [9], эпоксиубихиноны (II) [10, 11], аналог убихинона с одной аминогруппой — родохинон (III) [12, 13], а также убихинон, содержащий одно насыщенное изопреноидное звено на конце цепи (IV) [14].



Пути биосинтеза убихинонов были экспериментально исследованы с помощью меченых 2- C^{14} -мевалоната и 2- C^{14} -ацетата [3-5]. Полиизопреноидная боковая цепь убихинона строится постепенным наращиванием. C_5 -звеньев аналогично механизму биосинтеза терпеноидов, таких, как сквален и каротиноиды.

Мевалоновая кислота (V) в 3 этапа превращается в трифосфопроизводное (VI). Из последнего в результате декар-

боксилирования и дефосфорилирования образуется изопентенилпирофосфат (VII) — «активный изопрен» или строительное звено C_5 .



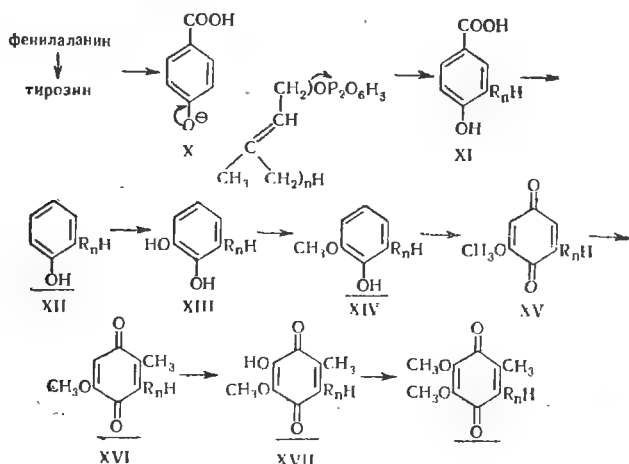
Δ^3 -Изопентенилпирофосфат способен изомеризоваться в диметилаллилпирофосфат (VIII), который является концевым звеном изопреноидных полимеров. Последовательным наращиванием диметилаллилпирофосфата на C_5 -звено биосинтезируются изопреноиды с увеличивающейся по длине углеродной цепочкой, такие, как геранилпирофосфат (IX, $n=1$), фарнезилпирофосфат (IX, $n=2$), геранилгеранилпирофосфат (IX, $n=3$) и др.

В животных тканях найден свободный спирт соланезол, отвечающий C_{45} -пирофосфату (IX, $n=8$) [15].

Открытие аллилпирофосфата, как алкилирующего средства в биосинтезе терпеноидов, явилось предпосылкой гипотезы о возможном механизме присоединения пренилпирофосфатов соответствующей длины к предшественнику ядра убихинона. В полуферментном пути биосинтеза убихинона в животных и бактериальных тканях такими предшественниками являются ароматические аминокислоты: фенилаланин и тирозин [16—18]. Превращения их в убихинон установлены после выделения из липидного экстракта *Rhodospirillum rubrum* нескольких биосинтетических предшественников [19—23].

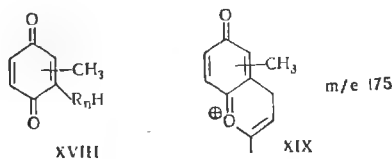
p -Оксибензойная кислота (X) после биосинтетического изопренилирования (XI) подвергается энзиматическому декарбоксилированию. Образующийся 2-мультипренилфенол (XII) был одним из первых предшественников убихинона, выделенных из *R. rubrum* ($n=10$). Выделены также 2-дека-

пренил-6-метоксифенол (XIV), 2-декапренил-3-метил-6-метоксихинон (XVI) и 2-декапренил-3-метил-5-окси-6-метоксихинон (XVII). Расстановка их в указанной схеме согласуется с концепцией биологического гидроксирования и метилирования. Экспериментально показано, что донором метильных групп является метионин, или, возможно, S-аденозилметионин [24].



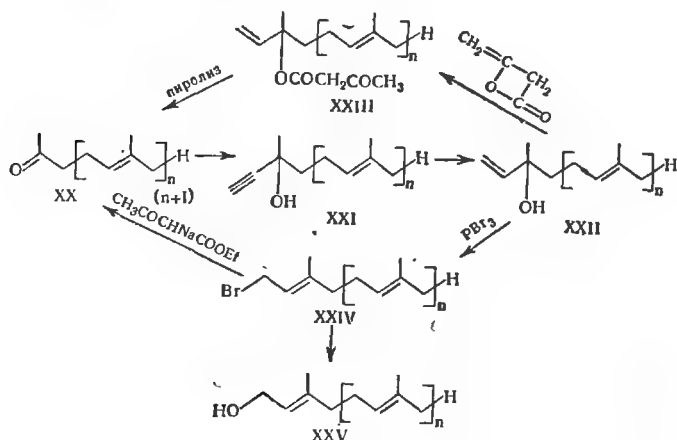
Из *R. rubrum* выделен еще один хинон — 2-декапренилхинон (XVIII), содержащий в хинонном ядре метильную группу [23].

Масс-спектрометрическое изучение этого соединения (наличие интенсивного пика иона с m/e 175, XIX) не позволило определить местоположение метильной группы. Если же метильная группа находится рядом с полиизопреноидной цепью, то такой хинон может быть предшественником не только убихинонов, но и витаминов группы К и пластохинонов.



Химический синтез убихинонов включает: синтез полиизопреноидной цепи, синтез ядра и их конденсацию [25].

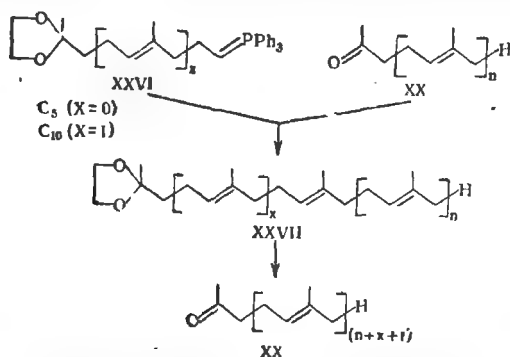
Изопреноидные звенья боковой цепи убикинонов связаны между собой по типу «голова к хвосту», двойные связи имеют транс-конфигурацию. Соответствующие ненасыщенные терпеноидные спирты с полной транс-конфигурацией двойных связей, необходимые для синтеза убикинонов, получены на основе использования методов, разработанных в химии терпеноидов [25, 26].



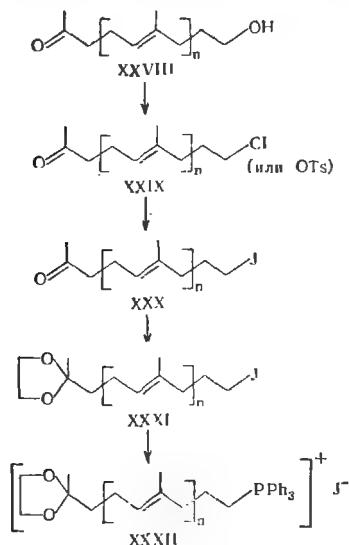
Конденсацией изопреноидного кетона (XX, n) с ацетиленидом натрия и частичным гидрированием образующегося ацетиленового карбинола (XXI) в третичный винилкарбинол (XXII) удлиняют углеродную цепь на 2 С-атома. Конденсация винилкарбинола (XXII) с дикетеном и пиролиз образующегося ацетоацетата (XXIII) приводят к следующему изопренологу — кетону (XX, $n + 1$), имеющему углеродную цепь, удлиненную на 5 С-атомов [27, 28]. Изопреноидные кетоны (XX) могут быть также получены из соответствующих третичных винилкарбинолов (XXII) через первичные бромиды (XXIV) [29]. От последних осуществляется переход к соответствующим первичным спиртам (XXV). Таким путем из C_{43} -кетона был получен первичный C_{45} -спирт (XXV, $n=8$), идентичный природному соланезолу [30].

Одним из путей синтеза полиизопреноидных кетонов явилось постепенное наращивание углеродной цепи на моно- и диизопреноидные звенья с использованием бифункциональных соединений в реакции олефинирования по Виттигу [31—33].

Изопреноидные кетоны, типа метилгептенона (XX, $n=1$), *транс*-геранилацетона (XX, $n=2$) и *транс*-фарнезилацетона (XX, $n=3$), вводят в реакцию олефинирования фосфорановой компонентой C_5 (XXVI, $x=0$) и C_{10} (XXVI, $x=1$). Образующиеся этиленкетали (XXXVII) с удлинённой углеродной цепью на 5 и 10 C-атомов подвергаются гидролизу в соответствующие изопреноидные кетоны (XX, $n+x+1$).



Синтез бифункциональных стереоизомерных фосфорановых компонент (XXVI) осуществлен соответственно из ацетопропилового спирта (XXVIII, $n=0$) и диизопреноидного



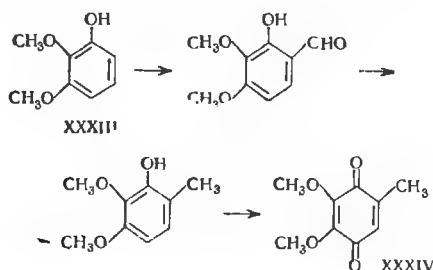
кетоспирта C_{10} (XXVIII, $n=1$) путем замены OH -группы на йод (XXX), последующей защиты карбонильной группы через этиленкеталь (XXXI) и образования фосфониевой соли (XXXII).

Разделение *цис*- и *транс*-изомеров предпочитают вести на стадии изопреноидных кетонов. Ректификацией получены геранил- и нерилацетон (C_{13}). Выделение *транс*-изомеров следующих изопренологов — кетонов достигается кристаллизацией при низких температурах [26].

Таковыми методами синтезированы все изопреноидные кетоны и спирты до C_{48} -кетона (соланезилацетона) и C_{50} -спирта (фарнезилфарнезилгераниллиналаола), из которых синтезированы убихиноны, содержащие от 5 до 50 углеродных атомов в боковой цепи.

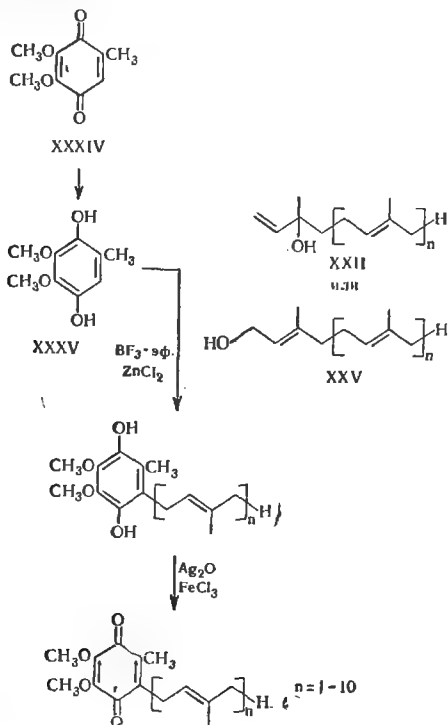
2,3-Диметокси-5-метилбензохинон — Q_0 — известен только как синтетический продукт. Вместе с тем показано, что он стимулирует дыхание митохондрий, из которых извлечены природные убихиноны избирательной экстракцией, однако в меньшей степени, чем Q_3 , Q_4 или Q_{10} [34].

Первый синтез Q_0 осуществлен из ванилина задолго до открытия убихинонов [35]. В литературе известен ряд способов его получения [5, 36]. Более удобный и малостадийный путь синтеза Q_0 (XXXIV) предложен из 1,2-диметилового эфира пирогаллола (XXXIII) [37, 38]:



Синтез убихинонов (I , $n=1-10$) включает электрофильное алкилирование 2,3-диметокси-5-метилгидрохинона (XXXV) соответствующими третичными (XXII) или первичными (XXV) *транс*-изопреноидными спиртами в присутствии кислых катализаторов и последующего окисления окисью серебра или хлорным железом до хинонов [25, 38]. Аналогично протекает синтез биологических предшественников [13].

Высшие гомологи — убихиноны представляют собой кристаллические продукты, Q₁—Q₅ — жидкости. Вследствие гидрофобного характера боковой цепи убихиноны нерастворимы в воде, зато растворяются в большинстве органических растворителей.

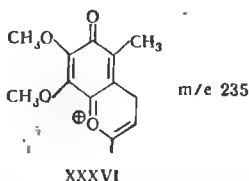


Они имеют специфический ультрафиолетовый спектр (λ_{max} 270—275 нм), на основании которого идентифицируют убихиноны из природных объектов [2—4]. Инфракрасные спектры изопренологов-убихинов содержат практически одинаковые полосы, свойственные их общему ядру [2—4].

Ядерный магнитный резонанс широко применяют для доказательства строения убихинов и их производных. Этим методом в химии убихинов можно определить не только характер протонов, длину боковой цепи, но и стереохимию изопреноидных двойных связей [39—41]. Различие в длине цепи кристаллических изопренологов Q₁₀, Q₉ и Q₈ показано рентгеноструктурным анализом [25].

Окислительно-восстановительные потенциалы для системы убинон-убигидрохин практически не зависят от длины боковой цепи. Величина окислительно-восстановительного потенциала, измеренного полярографическим методом, составляет $E_0 = 98$ мв [42].

В последние годы широко изучали масс-спектрометрию убинонов [43, 44]. Главной особенностью фрагментации молекулы убинонов явилось наличие интенсивного пика с m/e 235, отвечающего пириллиевому иону (XXXVI), свойственному всем убинонам. Между этим пиком и молекулярным ионом проявляются только пики низкой интенсивности, ответственные за ритмичный распад изопреноидной цепи.



При газо-жидкостной хроматографии убинонов обнаружена зависимость логарифма времени удерживания от числа изопреноидных звеньев, графически представляющая собой прямую линию [45—47]. Полученная зависимость позволяет графически предопределять значения времени удерживания τ_g для гомологов-убинонов, которые в данных условиях не определялись, и, следовательно, идентифицировать гомологичные убиноны при анализе природных их смесей в биологических объектах (рис. 40).

Убинон Q_{10} медленно превращается в животном организме в свой циклический изомер-убихроменол (XXXVII), который является его равноправным партнером в большинстве тканей (10% от содержания Q_{10} [48]. Выделенный из почек человека убихроменол-50 является оптически активным [49]. Показана фотохимичес-

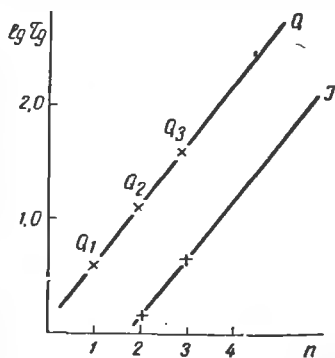
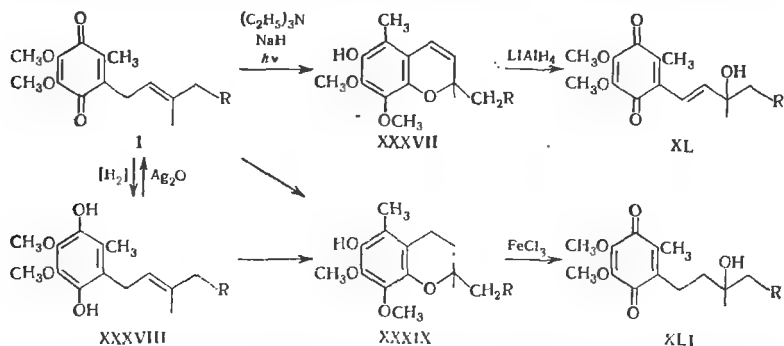


Рис. 40. Зависимость времени удерживания ($\lg \tau_g$) от числа изопреноидных звеньев (n).

кая циклизация убихинона в хроменол [50]. Синтез убихроменолов осуществляют с высоким выходом из убихинонов в присутствии оснований [51—53].



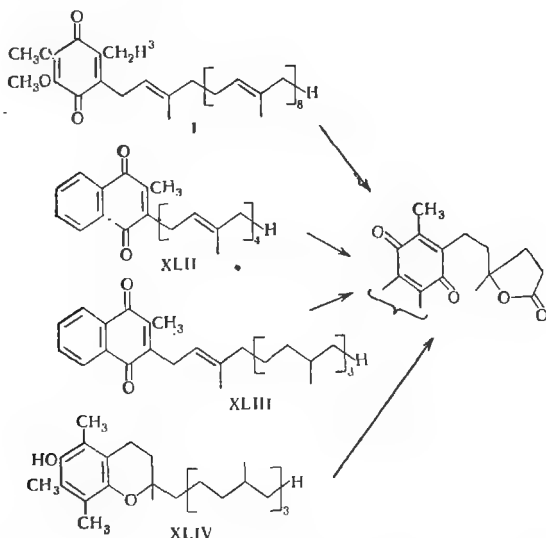
Убихиноны легко восстанавливаются в свою гидрохинонную форму QH_2 (XXXVIII), которая превращается без изменения в молекулярном составе в убихроманол (XXXIX). В биологических системах убихинон присутствует в форме хинон-гидрохинон. Хромановое производное убихинонов не выделено из каких-либо биологических объектов, хотя ему и приписывалась возможная роль в фосфорилирующих реакциях.

Известные методы синтеза хроманолов в ряду убихинонов осложняются нежелательной внутримолекулярной циклизацией изопреноидной цепи [54]. Описан синтез хроманола Q_{10} под влиянием хлорного железа и аскорбиновой кислоты [55]. Однако точное повторение указанных условий для синтеза менахроманола-3 и определение характера протонов по спектру ЯМР свидетельствуют о возможной частичной циклизации изопреноидной цепи и этим методом [56].

Действие на хроманол (XXXIX) хлорного железа [57] или на хроменол (XXXVII) алюмогидрида лития [58] приводит к соответствующим оксихинонам (XL и XLI). Оптические свойства последних могут быть использованы для определения оптической активности при втором углеродном атоме хроманола или хроменолоа. Обсуждался вопрос о природном происхождении оксихинонов (XL и XLI), как возможных метаболитов изопреноидных хинонов.

Было показано, что Q_9 , так же как менахинон-4 (XLII) и филлохинон (XLIII), различающиеся по длине изопреноидной цепи и степени ее ненасыщенности, расщепляется у

крыс до таких же метаболитов, что и токоферолы (XLIV) [59].

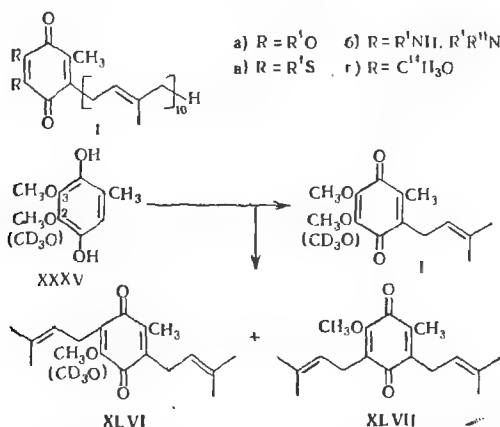


У изопреноидных хинонов, так же как и у токоферолов, происходит окислительное укорочение боковой цепи до 7 углеродных атомов с образованием конечной карбоксильной группы. Метаболиты переходят в мочу в виде конъюгатов, вероятнее всего глюкуронидов, которые после гидролиза выделяются в виде γ -лактона, так называемого метаболита Симона (XLV). Синтез последнего для убихинонов осуществлен из левулиновой кислоты [60].

Известна способность одной или обеих метоксигрупп убихинонов подвергаться нуклеофильному замещению. На этом основании синтезированы высшие алкокси-аналог (I,a), азот- (I,b) и серу- (I,v)-содержащие производные и радиоактивный по метоксигруппе убихинон (I,g) [61]. На этом же принципе основан метод колориметрического определения Q_{10} в крови и моче человека: с цианэтилацетатом образуется голубая окраска, обязанный продукту реакции нуклеофильного замещения метоксигрупп Q_{10} [62].

Необычное электрофильное замещение метоксигрупп на диметилаллильный остаток наблюдалось при взаимодействии 2,3-диметокси-5-метилгидрохинона (XXXV) с диметилвинилкарбинолом в условиях синтеза Q_1 [63]. Синтез и масс-спектрометрическое изучение дейтерированных ядра,

Q₁ и продуктов его дальнейшего превращения показали, что имеет место образование двух аналогов Q₁ (XLVI) и (XLVII): электрофильное замещение по С-2- и С-3-положениям [64].



Коферментные функции убинона, как участника транспорта электронов в дыхательной цепи, были постулированы на основании изучения концентрации его в митохондриях, кинетики окислительно-восстановительных реакций, действия ингибиторов, а также влияния экстракции убинона на ферментативную активность митохондрий [2—6].

Был высказан ряд гипотетических химических предположений, объясняющих участие убинонов, так же как и близких ему по строению витаминов К и пластохинонов, в синтезе «активного фосфата» в виде фосфорных эфиров хинола или хроманола [65—68].

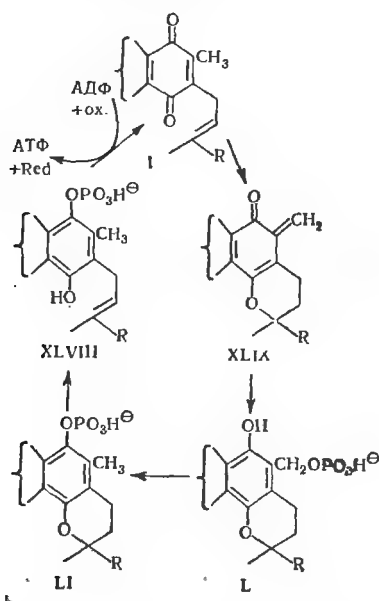
Работы [69—71] по окислению фосфорных эфиров хинола *in vitro* послужили основанием считать их переносчиками фосфатного остатка на АДФ. Было показано, что монофосфат хинола Q₆ способен медленно окисляться субмитохондриальными препаратами [72]; в то же время монофосфат Q₁₀ синтезированный Shunk и др. [73], не проявлял коферментной активности в сукцинатоксидазной системе [72]. Подтверждением роли фосфатов хинола, как промежуточной фосфорилирующей формы, явилось выделение из *Mycobacterium phlei* с незначительным выходом монофосфорного эфира витамина К [74].

Из *M. phlei* был выделен 6-хроманилфосфат филлохинона и показано, что он подвергается энзиматическому окис-

лению цитохромом С с образованием АТФ [75]. Критическая оценка химических свойств хроманилфосфатов дана Scott [76].

Фосфорилированное производное убикинона не выделено из каких-либо биологических объектов. Однако их структурное сходство с витаминами К давало основание предполагать возможность существования таких промежуточных соединений.

Каждая из предлагаемых в литературе гипотетических схем участия хинонов в синтезе АТФ предусматривала промежуточную метиленхинонную форму [65—68]. Теоретическая схема Ледерера в некоторой степени объединяла основные идеи других авторов:



Синтез АТФ мог происходить при окислении фосфорного эфира гидрохинона (XLVIII) в хинон (I). Неорганический фосфат должен был включаться в акт фосфорилирования присоединением к изомерной хинону (I) метиленхинонной форме (XLIX) в положения 1,4. Был получен ряд химических доказательств, определяющих возможность существования таких промежуточных соединений, в частности,

Показано, что в кислых условиях может происходить изомеризация филлохинона в метилехинохроман [77]. Следующим подтверждением явилось 1,4-присоединение фосфорной кислоты к модельному метилехинону с образованием фосфорного эфира [78]. В ряду убихинонов такой эфир (L) синтезирован для гексагидро- Q_4 [79]. Роль метилехиноновой формы, как акцептора фосфата, обсуждалась также в работах [68, 78]. Допущением схемы Ледерера являлось раскрытие пиранового кольца фосфата хромола (LI) в фосфорный эфир гидрохинона (XLVIII).

Возможность существования метилехиноновой формы составила предмет дискуссии последних лет [80—84]. Экспериментальных данных, свидетельствующих о роли таких соединений в живой клетке, нет. Биологические эксперименты с мечеными хинонами (в α - и β -положениях цепи — дейтерий или тритий, кислород O^{18}) исключают возможность существования метилехинонов [82, 83].

Вопрос о фосфорилированном производном убихинона и его роли в синтезе АТФ продолжает оставаться предметом исследований и дискуссий.

ЛИТЕРАТУРА

1. IUPAC — IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochem. j.*, 1967, 102, 15.
2. Wagner A., Folkers K. *Vitamins and Coenzymes*. New York, 1964.
3. *Biochemistry of Quinones*, ed. R. A. Morton, Acad. Press. New York, 1965.
4. *Vitamins and Hormones*. V. 24 Acad. Press. New York — London, 1966.
5. Самохвалов Г. И., Обольникова Е. А. *Усп. хим.*, 1967, 36, 1012.
6. Ramasarma T. *Adv. in Lipid Res.*, 1968, 6, 107.
7. Daves G., Muraca R., Wittick J., Friis P., Folkers K. *Biochemistry*, 1967, 6, 2861.
8. Friis P., Daves G., Folkers K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1966, 24, 252.
9. Threlfall D., Whistance G. *Biochem. J.*, 1969, 113, 38P.
10. Friis P., Daves G., Folkers K. *Biochemistry*, 1967, 6, 3618.
11. Farley Th., Blake J., Folkers K. *Intern. J. Vitam. Res.*, 1969, 39, 168.
12. Parson W., Rudney H. J. *Biol. Chem.*, 1965, 240, 1853.
13. Daves G., Wilczynski J., Friis P., Folkers K. *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, 90, 5587.
14. Lavate W., Dyer J., Springer C., Bentley R. J. *Biol. Chem.*, 1965, 240, 524.
15. Gloor U., Wiss O. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1960, 2, 222.
16. Olsen R. *Vitamins and Coenzymes*. New York, 1964, 551.
17. Whistance G., Threlfall D., Goodwin T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1966, 23, 849.

18. Griffiths W., Threlfall D., Goodwin T. *Biochem. J.*, 1967, 103, 589.
19. Olsen R., Smith J., Daves G., Moore H., Folkers K., Parson W., Rudney H. *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, 87, 2298.
20. Olsen R., Daves G., Moore H., Folkers K., Rudney H. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1966, 88, 2346.
21. Olsen R., Daves G., Moore H., Folkers K., Parson W., Rudney H. *J. Am. Chem.*, 1966, 88, 5919.
22. Friis P., Daves G., Folkers K. *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, 88, 4754.
23. Friis P., Nilsson L., Daves G., Folkers K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, 28, 324.
24. Jackman L. *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 141, 1.
25. Ciba Foundation Symposium Quinones in Electron Transport, J. and A. Churchill Ltd., London, 1961.
26. Isler O., Rüegg R., Langemann A. *Chem. Weekbl.*, 1960, 56, 613.
27. Kimel W., Sax K., Kaiser S., Eichmann G., Chase G., Orner A. *J. Org. Chem.*, 1958, 23, 153.
28. Воробьева Г. А., Сарычева И. К., Преображенский Н. А. *ЖОХ*, 1959, 29, 2314.
29. Isler O., Rüegg R., Chopard-dit-Jean L., Winterstein A., Wiss O. *Helv. Chim. Acta*, 1958, 41, 687.
30. Rüegg R., Gloor U., Langemann A., Kofler M., Planta C., Ryser G., Isler O. *Helv. Chim. Acta*, 43, 1745, 1960.
31. Обольникова Е. А., Янотовский М. Ц., Самохвалов Г. И. *ЖОХ*, 1964, 34, 1499.
32. Обольникова Е. А., Давыдова Л. П., Кабошина Л. Н., Валашек И. Е., Янотовский М. Ц., Самохвалов Г. И. *ЖОХ*, 1964, 34, 3975.
33. Обольникова Е. А., Давыдова Л. П., Кабошина Л. Н., Валашек И. Е., Янотовский М. Ц., Самохвалов Г. И. *Проблемы органического синтеза*. М., 1965, 49.
34. Райхман Л. М., Блюменфельд Л. А. *Биохимия*, 1967, 32, 388.
35. Anslow W., Ashley J., Raistrick H. *J. Chem. Soc.*, 1938, 439.
36. Weinstock L., Tull R., Handelsmen B., Schoenewaldt E. *J. Chem. and Engng. Date*, 1967, 12, 154.
37. Обольникова Е. А., Волкова О. И., Самохвалов Г. И. Авт. свид. № 197598. Бюл. изобр., 13 (9.6.1967).
38. Обольникова Е. А., Волкова О. И., Самохвалов Г. И. *ЖОХ*, 1968, 38, 459.
39. Sommer P., Kofler M. *Vitamins and Hormones*. Acad. Press. New York — London, 1966, 364.
40. Wilczynski J., Daves G., Folkers K. *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, 90, 5593.
41. Bates R., Carhigham R., Rakutis R., Schauble J. *Chem. Ind.*, 1962, 1020.
42. Moret V., Pinamonti S., Fornasari E. *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 54, 381.
43. Maraca R., Whittick J., Daves G., Friis P., Folkers K. *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 89, 1505.
44. Morimoto H., Shima T., Imada I., Sasaki M., Ouchida A. *Lieb. Ann.*, 1967, 702, 137.
45. Morimoto H., Shima T., Imada I. *Biochem. Z.*, 1965, 343, 329.
46. Янотовский М. Ц., Козлов Э. И., Обольникова Е. А., Волкова О. И., Самохвалов Г. И. *ДАН СССР*, 1968, 179, 733.
47. Yanotovskii M. Ts., Kozlov E. I., Obol'nikova E. A., Volkova O. I., Samokhvalov G. I. *J. Gas. Chromatography*, 1968, 6, 520.
48. Raman T., Rudney H. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1966, 116, 75.

49. Hemming F., Laidman D., Morton R., Pennock J. *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **38**, 193.
50. Moore H., Folkers K. *Lieb. Ann.*, 1965, **684**, 212.
51. Morimoto H., Imada I. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 1964, **12**, 739, 1047.
52. McHale D., Green J. *Chem. and Ind.*, 1962, 1867.
53. Linn B., Shunk C., Wong E., Folkers K. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 239.
54. Hoffman C., Trenner N., Wolf D., Folkers K. *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, **82**, 4744.
55. Moore H., Folkers K. *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, **86**, 3393.
56. Козлов Э. И., Обольникова Е. А., Самохвалов Г. И. *ЖОХ*, 1967, **37**, 544.
57. Mayer H., Isler O. *Chimia*, 1966, **20**, 158.
58. Morimoto H., Imada I., Sasaki M. *Lieb. Ann.*, 1965, **690**, 115.
59. Gloor U., Würsch J., Mayer H., Isler O., Wiss O. *Helv. Chim. Acta*, 1966, **49**, 2582.
60. Bláha L., Weichet J. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1965, **30**, 2068.
61. Shunk C., McPherson J., Folkers K. *J. Org. Chem.*, 1960, **25**, 1053.
62. Redalieu E., Nilsson J., Nilsson L., Kjaer-Pedersen D., Folkers K. *Intern. J. Vitam. Res.*, 1968, **38**, 345.
63. Обольникова Е. А., Волкова О. И., Головкина Л. С., Вульфсон Н. С., Самохвалов Г. И. *ЖОХ*, 1969, **39**, 2769.
64. Обольникова Е. А., Головкина Л. С., Вульфсон Н. С., Самохвалов Г. И. *ЖОХ*, 1970, **40**, 2333.
65. Chmielewska I. *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **39**, 170.
66. Vilkas M., Lederer E. *Experientia*, 1962, **18**, 546.
67. Williams R. J. *Theor. Biol.*, 1962, **3**, 209.
68. Erickson R., Wagner A., Folkers K. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 1535.
69. Clark V., Kirby G., Todd A. *Nature (Lond.)*, 1958, **181**, 1650.
70. Wieland T., Pattermann F. *Angew. Chem.*, 1958, **70**, 313. *Chem. Ber.*, 1959, **92**, 2917.
71. Clark V., Hutchinson D., Kirby G., Todd A. *J. Chem. Soc.*, 1961, 715.
72. Gruber W., Hohl R., Wieland T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1963, **12**, 242.
73. Shunk C., McPherson J., Folkers K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1961, **6**, 124.
74. Watanabe T., Brodie A. *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.*, 1966, **56**, 940.
75. Asano A., Brodie A., Wagner A., Wittreich P., Folkers K. *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, PC 2411.
76. Scott P. J. *Biol. Chem.*, 1965, **240**, 1374.
77. Cohen P., Mamont P. *Bull. Soc. Chim. France*, 1967, 1164.
78. Lederer E., Vilkas M. *Vitamins and Hormones*. V. 24. Acad. Press, New York—London, 1966, 409.
79. Wagner A., Lusi A., Shunk C., Linn B., Wolf D., Hoffman C., Erickson R., Arison B., Trenner N., Folkers K. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 1534.
80. Lapidot A., Silver B., Samuel D. *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 5537.
81. Parson W., Rudney H. *Biochemistry*, 1966, **5**, 1013.
82. DiMari S., Snyder C., Rapoport H. *Biochemistry*, 1968, **7**, 2308.
83. Snyder C., Rapoport H. *Biochemistry*, 1968, **7**, 2318.
84. Clark V., Hutchinson D. *Progr. Org. Chem.*, 1968, **7**, 75.

**О роли убихинона в переносе электронов
по дыхательной цепи**

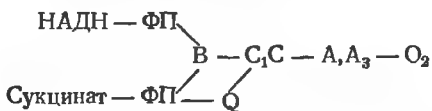
Есть несколько категорий фактов, указывающих на участие убихинона (коэнзима. Q) в главной цепи переноса электронов в митохондриях. Спектрофотометрически показано, что убихинон подвергается окислению и восстановлению в процессе функционирования дыхательной цепи [1]. Экстракция убихинона из митохондрий приводит к потере сукцинат- и НАДН-дегидрогеназной активности, а добавление его в экстрагированные митохондрии специфически восстанавливает активность этих ферментных систем [2—4]. Убихинон реагирует с тремя изолированными комплексами дыхательной цепи, специфически окисляя I и II комплексы и восстанавливая III комплекс [5]. Кроме того, он может восстанавливаться препаратами глицеро-1-фосфатдегидрогеназы и флавопротеидами, участвующими в окислении жирных кислот [6, 7]. Это подтверждает мнение [8], что убихинон играет в дыхательной цепи роль универсального «сборщика» электронов.

Однако убихинон непосредственно не реагирует с флавопротеидами. Предполагается, что электронными переносчиками между флавинами и убихиноном служат специальные белки, содержащие негеминное железо [9]. В восстановлении убихинона участвуют также сульфгидрильные группы [10]. Помимо этого, показано, что экстракция фосфолипидов из митохондрий или обработка их фосфолипазой ингибирует перенос электронов на убихинон [11].

Несмотря на наличие большого числа данных, указывающих, несомненно, на функционирование убихинона в качестве электронного переносчика, есть ряд фактов, заставляющих усомниться в том, что он участвует в главной цепи переноса электронов. В самом деле, если убихинон является обязательным компонентом дыхательной цепи, то скорость его окисления и восстановления должна быть по крайней мере такой же, как и общая скорость окисления субстрата. Однако еще в 1960 г. Redfearn и Rumphrey [12], определяя кинетику окислительно-восстановительных переходов, пришли к выводу, что скорость восстановления уби-

хинона любым субстратом (будь то сукцинат или НАДН) меньше, чем скорость окисления этого субстрата. Поэтому они предположили, что убихинон находится в ответвлении дыхательной цепи. В соответствии с этим предположением Redfeapn находятся и его более поздние данные о частичном сохранении дыхания при полной экстракции убихинона [13], что противоречит, однако, результатам, полученным в лаборатории Green [14] об отсутствии дыхания в митохондриях при извлечении из них убихинона.

Прямое спектрофотометрическое исследование кинетики окислительно-восстановительных переходов убихинона, проведенное Chance с помощью дифференциального двухлучевого спектрофотометра, подтвердило основные данные об относительно медленном восстановлении митохондриального убихинона [15]. В недавней работе Chance, выполненной с применением метода быстрой остановки реакции, показано, что в то время, как период полувосстановления цитохромов C, C₁ и флавинов в присутствии цианида составляет 70—100 миллисекунд, для убихинона этот период почти на порядок больше — 900 миллисекунд [16]. В этой работе также показано, что убихинон значительно лучше, чем НАДН, восстанавливается сукцинатом и сделан вывод, что он не находится на пути переноса электронов от НАДН. Кроме того, предполагается, что восстановление убихинона изолированным комплексом I (НАДН-Q-редуктаза) отличается по механизму от восстановления убихинона в митохондриях, так как в первом случае наиболее активен Q₁, а во втором — Q₁₀. Месторасположение убихинона в дыхательной цепи по Chance [16] можно представить таким образом:



Надо отметить, однако, что данные Chance о более быстром восстановлении Q₁ по сравнению с Q₁₀ в случае изолированного комплекса I противоречат недавним результатам [17], согласно которым в НАДН-дегидрогеназе Q₁ имеет наиболее низкую активность, а при удлинении изопреноидной цепи скорость восстановления гомологов убихинона возрастает так, что быстрее всех восстанавливается Q₁₀. В то же время скорость окисления убихинона на сукцинат-дегидрогеназном участке (комплекс II) не зависит от дли-

ны изопропоидной цепи. Возможно, таким образом, что механизмы окисления убихинона на НАДН-дегидрогеназном и сукцинатдегидрогеназном участках несколько различны.

Убихинон и окислительное фосфорилирование

Результаты работ на модельных системах показывают, что хиноны могут участвовать в осуществлении фосфорилирования [18—20]. Имеется также и ряд биохимических наблюдений, указывающих на возможную связь убихинона с системой фосфорилирования в митохондриях. Значительный интерес представляет обнаруженное Chance и подтвержденное другими авторами [21, 22], ускорение восстановления убихинона в фосфорилирующих препаратах по сравнению с нефосфорилирующими. О различной реактивности убихинона в фосфорилирующих и нефосфорилирующих препаратах свидетельствуют также наблюдения Eresinska и Szarkowska [23] об уменьшении чувствительности окисления убихинона к антимицину при разобщении дыхательной цепи динитрофенолом.

Неоднозначные результаты были получены при исследовании влияния неорганического фосфата (Φ_H) и аденозиндифосфорной кислоты (АДФ) на уровень восстановления убихинона в фосфорилирующих митохондриях. По Hatefi [24], наличие в среде Φ_H повышало восстановленность убихинона, а последующее добавление АДФ приводило к его окислению. Эти результаты, по мнению Green [25], свидетельствуют об образовании макроэргических промежуточных веществ. В отличие от Hatefi авторы работы [12] наблюдали лишь незначительное уменьшение восстановленности убихинона в интактных митохондриях при добавлении АДФ в присутствии сукцината и Φ_H . Szarkowska, Klingenberg, применив усовершенствованный метод двулучевой спектрофотометрии, показали в отличие от Hatefi, что сукцинат вызывает интенсивное восстановление убихинона и без Φ_H [26]. Добавление АДФ в отсутствие Φ_H не влияло на степень восстановления убихинона, однако при последующем введении в среду Φ_H , когда начиналось активное фосфорилирование, происходило окисление убихинона (хотя и не очень выраженное — на 10—12%). По данным этих авторов, степень восстановления его зависит от сопряженности системы. Показано, что при повышении фосфорилирующего потенциала повышается и уровень восстановленности убихинона. Это указывает на то, что убихинон,

возможно, является частью системы синтеза АТФ, но не подтверждает образование при окислении фосфорилированных производных убихинона, предполагавшихся во многих химических моделях.

Об определенной связи убихинона с фосфорилированием говорят также данные [27] о том, что восстановление его при добавлении сукцината выражено только в митохондриях с достаточной степенью дыхательного контроля, т. е. способных к фосфорилированию. Неожиданным в этой работе явилось то обстоятельство, что общее содержание убихинона в активном состоянии было на 20% меньше, чем в так называемом контролируемом (когда не происходит фосфорилирования); это указывает на переход части убихинона в какую-то связанную форму.

Таким образом, несмотря на проведенные многочисленные исследования, в вопросе о биохимической роли убихинона имеется много противоречивых данных и конкретный механизм участия убихинона в окислительном фосфорилировании остается неясным.

Свободнорадикальные формы убихинона в митохондриях

Исходя из общих соображений, следует ожидать, что убихинон, как и другие соединения с хиноидной структурой, должен образовывать в процессе окислительно-восстановительных превращений промежуточные семихинонные свободнорадикальные формы. При исследовании митохондрий методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в них действительно были обнаружены сигналы ЭПР с g -фактором, близким к 2,0, характерные для семихинонов [28, 29]. Однако из имеющихся в митохондриях хиноидных структур только для флавинов найдены доказательства, что их свободнорадикальные формы вносят вклад в семихинонный сигнал митохондрий [30]. Chance [21] при кинетических исследованиях не удалось получить каких-либо указаний на образование промежуточных свободнорадикальных форм убихинона. В работе В. М. Чумакова и И. А. Э. Калмансона [31] показано, что при некоторых специальных условиях (обработка спиртовым раствором щелочи в атмосфере аргона) в митохондриях удается наблюдать большую концентрацию семихинонной формы убихинона. Однако состояние его в обработанных таким образом препаратах может существенно отличаться от его состояния

В нативных митохондриях, что не позволяет судить о существовании семихинонной формы в нормально функционирующих структурах. Мы выясняли возможность образования семихинона Q_{10} в нормально функционирующих митохондриях путем исследования спектров ЭПР интактных препаратов и экстрагированных митохондрий, лишенных эндогенного убихинона, которые инкубировались в физиологических условиях и перенос электронов в которых мог быть восстановлен введением эндогенных препаратов убихинона [32, 33].

Как видно на рис. 41, в экстрагированных митохондриях меньше как исходная интенсивность сигнала, так и его увеличение под действием сукцината. Сигнал экстрагированных митохондрий в отличие от интактных не изменяется при последовательном введении Φ_n и АДФ. В экстрагированных митохондриях полностью подавлено фосфорилирование, и АДФ также не стимулирует дыхания.

Включение Q_{10} в экстрагированные митохондрии приводит к значительному увеличению индуцируемого субстратом сигнала (в среднем на 80%) и восстанавливает его зависимость от Φ_n , но не от АДФ. Введение Q_{10} приводило также к значительному увеличению дыхания, но не к восстановлению фосфорилирования, что связано, по-видимому, с нарушением мембранных структур при экстракции убихинона.

Антимицин (0,5 мкг/мл) почти на 80% тормозит дыхание как в интактных, так и в экстрагированных митохондриях с включенным Q_{10} и наряду с этим увеличивает степень восстановленности Q_{10} (рис. 42). Обработка антимицином в обоих случаях приводит к слабому увеличению семихинонного сигнала ЭПР. п-Хлормеркурибензоат (ПХМБ, $10^{-4}M$), блокирующий SH-группы, также значительно ингибирует дыхание как в нативных, так и в экстрагированных митохондриях, инкубированных с Q_{10} . Однако в отличие

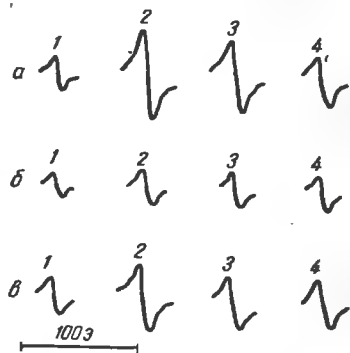


Рис. 41. Сигналы ЭПР митохондрий.

1 — без добавления субстрата, 2 — при последовательном добавлении сукцината, 3 — Φ_n , 4 — АДФ; а — интактные митохондрии; б — экстрагированные; в — экстрагированные с включением Q_{10} . Условия опыта [33].

от антимицина в этом случае резко уменьшается способность сукцината вызывать увеличение сигнала при одновременном значительном уменьшении уровня восстановленности Q_{10} . Теноилтрифторацетон (10^{-4} М), связывающий

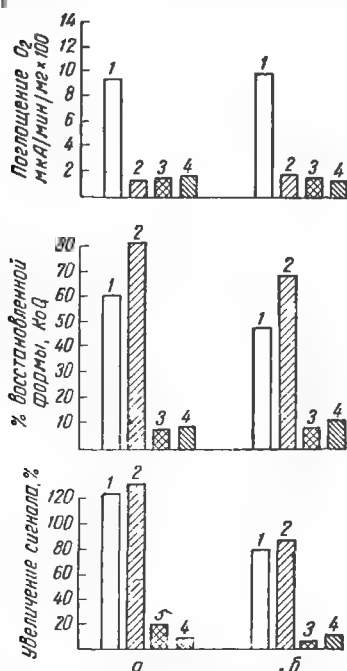


Рис. 42. Влияние ингибиторов на величину индуцированного сукцинатом сигнала, уровень восстановленного Q и интенсивности дыхания интактных митохондрий (а) и экстрагированных митохондрий с включением Q (б).

1 — без ингибитора, 2 — антимицин, 3 — ПХМБ, 4 — теноилтрифторацетон.

негеминное железо в сукцинатоксидазе, оказывает сходное с ПХМБ влияние на дыхание, величину индуцированного субстратом сигнала и уровень восстановленности убихинона как в нативных, так и в экстрагированных митохондриях с включением Q_{10} . Таким образом, включенный в экстрагированные митохондрии Q_{10} участвует в ферментативном переносе электронов в дыхательной цепи, причем место его действия, как и эндогенного убихинона в интактных митохондриях, находится с субстратной стороны антимициночувствительного участка, а в его восстановлении участвуют ферментные системы, содержащие SH-группы и негеминное железо.

Приведенные данные, по-видимому, свидетельствуют о том, что семихинонный сигнал ЭПР митохондрий, по крайней мере частично, обусловлен свободнорадикальной формой убихинона. Количество убихинона, находящегося в свободнорадикальной

форме, однако, весьма невелико. Общее содержание его в митохондриях составляет 4—5 мкмоль/г белка, т. е. $3 \cdot 10^{18}$ молекул, а интенсивность сигнала ЭПР митохондрий в наших опытах соответствовала не более чем $5 \cdot 10^{16}$ спинов на 1 г белка. Это означает, что, если бы даже весь семихинонный сигнал митохондрий был обусловлен

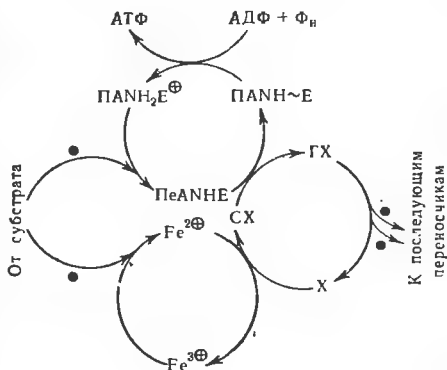
убихиноном, в свободнорадикальной форме в каждый данный момент времени находится не более 2% митохондриального убихинона.

О механизме участия убихинона в окислительном фосфорилировании

На основе анализа поведения свободных радикалов в митохондриях, находящихся в разных метаболических состояниях, нами ранее было выдвинуто предположение, что хиноидные компоненты дыхательной цепи получают электроны от двух разных предшественников, один из которых связан со структурно организованными ферментными системами, синтезирующими АТФ (АТФ-синтезирующий участок) (рис. 43) [32]. В случае убихинона, возможность образования семихинонных форм которого в функционирующих митохондриях показана в наших работах [32, 33], такое предположение кажется особенно приемлемым, так как позволяет объяснить ряд особенностей его функционирования в дыхательной цепи. Наиболее интересной из них является относительно большая концентрация убихинона в митохондриях по сравнению с другими электронными переносчиками. Это, по-видимому, нужно для того, чтобы затруднить получение одной молекулой убихинона двух электронов по одному пути. В результате конкуренции между образовавшимися семихинонами и хинонами уменьшается вероятность последовательного получения молекулой хинона двух электронов на одном реакционном центре.

Рис. 43. Схема предполагаемого участия семихинонных радикалов в переносе электронов по дыхательной цепи и фосфорилировании.

П- и Пе — соответственно окисленная и восстановленная формы переносчика, структурно связанного с АТФ — СУ; А — адениновое кольцо связанного аденинуклеотида, Fe^{3+} и Fe^{2+} — окисленная и восстановленная форма негеминного железа, E^+ — электрофильная функциональная группа фермента, участвующая в образовании первичного макроэрга $NH \sim E$, X, CX и GX — соответственно окисленная, полувосстановленная и восстановленная формы хиноидных структур.



Худшая растворимость семихинона в липидной фазе по сравнению с хинонной или гидрохинонной формой должна затруднять его диффузию в липидной фазе к цитохромному комплексу, где он мог бы окислиться. Это также повышает вероятность того, что семихинон успеет получить электрон от второго донора (связанного, как мы предположили в работе [32], с ферментами АТФ-синтезирующего участка), осуществив, таким образом, акт фосфорилирования и восстановившись при этом до гидрохинона. Последний в силу хорошей растворимости в липидах сможет легко диффундировать к цитохромному комплексу, окисляться там до хинонов, которые также легко смогут диффундировать к электронно-донорным участкам сукцинат-Q-редуктазного (или НАДН-Q-редуктазного) комплекса. Согласно этой схеме, в каждый данный момент в семихинонной форме должна быть лишь небольшая часть молекул Q_{10} , что соответствует тому экспериментальному факту, что основная часть Q_{10} в митохондриях находится в хинонной и гидрохинонной, но не в радикальной форме.

Из предлагаемой схемы вытекает также, что восстановление убихинона, если он получает электроны из двух источников, один из которых связан с АТФ-синтезирующим участком, должно быть относительно медленным процессом в фосфорилирующих митохондриях и происходить более быстро в нефосфорилирующих препаратах, где отсутствуют структурные препятствия для непосредственного взаимодействия убихинона с электронными переносчиками, предшествующими АТФ-синтезирующему участку. Действительно, Чапсе было показано, что в нефосфорилирующих препаратах убихинон восстанавливается быстрее, чем в фосфорилирующих [21]. Но даже в нефосфорилирующих препаратах восстановление происходит медленнее, чем скорость его окисления цитохромным комплексом. Именно восстановление убихинона является лимитирующей реакцией переноса электронов в системах сукцинатоксидазы и НАДН-оксидазы [3]. При очень интенсивном дыхании не исключена, однако, возможность того, что убихинон может получить оба электрона от одного предшественника, причем эта вероятность должна возрастать с увеличением интенсивности дыхания. По-видимому, этим и объясняется тот факт, что эффективность фосфорилирования (коэффициент P/O) обычно понижается с увеличением интенсивности дыхания.

В предлагаемой здесь схеме участие хинонов в процессе сопряжения не связывается с образованием фосфорилиро-

ванных производных. Несмотря на наличие ряда факторов, указывающих на взаимодействие между убихиноном и фосфатом, в настоящее время нет серьезных оснований полагать, что в митохондриях имеет место образование фосфорилированных производных убихинона, которые могли бы играть роль промежуточных соединений в процессе окислительного фосфорилирования. Но возможно, по-видимому, некоторое косвенное взаимодействие между ним и фосфатом через посредство определенных ферментных систем, способных взаимодействовать как с фосфатом, так и с убихиноном.

Интересно в связи с этим отметить, что в *Mycobacterium phlei*, где нет убихинона, а вместо него содержится витамин К (производное нафтохинона), удалось выделить фосфорилированное производное нафтохинона и показать образование промежуточных хроманольных форм витамина К при фосфорилировании [35]. Существенно при этом, что *M. phlei* в отличие от митохондрий характеризуются отсутствием дыхательного контроля. Это указывает, что окислительное фосфорилирование в таких бактериях является более примитивным процессом, чем в дыхательной цепи митохондрий высших организмов. Возможно, в ходе эволюции наряду с усложнением механизмов окислительного фосфорилирования изменилась и роль хинонов, которые в более высокоорганизованных системах приспособлены для выполнения функций, связанных с возможностью осуществления дыхательного контроля и обеспечения более совершенных механизмов сопряжения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hatefi J. Biochim. Biophys. Acta, 1959, 31, 490.
2. Lester R., Fleischer S. Biochim. Biophys. Acta, 1961, 47, 358.
3. Hatefi J. Adv. Enzymol., 1963, 25, 291.
4. Szarkowska L. Archiv. Biochem. Biophys., 1966, 113, 519.
5. Green D., Wharton D., Tzagoloff A., Rieske J., Brierly G. В кн.: Oxidases and related redox systems. V. 2. New York — London, 1965, 1032.
6. Szarkowska L., Drabikowska N. Life Sci., 1963, 7, 519.
7. Beinert H., Griffiths D., Wharton D., Lands R. J. Biol. Chem., 1962, 237, 2337.
8. Klingenberg M. Ber Phys.-Med. Ges. Wurzburg., 1965, 71, 174.
9. Ziegler D. В кн.: Bidl. Structure and Function. V. 2. Acad. Press. New York, 1961, 253.
10. Minakami M., Estabrook R. J. Biol. Chem., 1964, 239, 2042.
11. Mashimist J., Singer T. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, 53, 467.
12. Redfearn E., Pumphrey A. Biochem. J., 1960, 76, 64.

13. Redfearn E., Burgos J. Nature, 1966, 209, 75.
14. Green D. Comprehensive Biochemistry, 14, Biological oxidation. Amsterdam, 1966.
15. Chance B., Redfearn E. Biochem. J., 1961, 80, 632.
16. Storey B., Chance B. Archiv. Biochem. Biophys., 1967, 121, 277.
17. Lenaz G., Davies G., Folkers K. Archiv. Biochem. Biophys., 1968, 123, 539.
18. Vilkas M., Lederer E. Experientia, 1962, 18, 546.
19. Lederer E. Experientia, 1964, 20, 473.
20. Обольникова Е. А. См. в этой книге стр. 134.
21. Chance B. В кн.: Quinones in Electron Transport. Ciba foundation symposium. London, 1961, 327.
22. Whittaker P., Redfearn E. Biochem. J., 1964, 92, 36.
23. Eresinska M., Szarkowska L. Inform. Exch. Group, 1, 1965, Sci. Memo 327.
24. Hatefi J. Biochim. Biophys. Acta, 1959, 31, 502.
25. Green D., Brierly G. В кн.: Biochem. of Quinones. Acad. Press. New York, 1965, 405.
26. Szarkowska L., Klingenberg M. Biochem. Z., 1963, 338, 674.
27. Snoswell A. Inform Exch Group, 1, 1965, Sci. Memo 317.
28. Commoner B., Hollocher T. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1960, 46, 405.
29. Руге Э. К., Блюменфельд Л. А. В кн.: Свободнорадикальные процессы в биологических системах. М., 1966, 170.
30. Ehrenberg A. В кн.: Structure and Properties of Biomolecules and biological systems, 1964, 7, 602.
31. Чумаков В. М., Калмансон А. Э. ДАН СССР, 1966, 170, 3.
32. Райхман Л. М., Блюменфельд Л. А. Биохимия, 1966, 31, 1127.
33. Райхман Л. М., Блюменфельд Л. А. Биохимия, 1967, 32, 388.
34. Кондрашова М. Н., Озрина Р. Д., Николаева Л. В. В кн.: Митохондрии, структура и функция. М., 1966, 120.
35. Gutnick D., Watanabe T., Brodie A. Feder Proc., 1966, 25, 1, 530.

ХИМИЯ ФЛАВИНОВЫХ КОФЕРМЕНТОВ

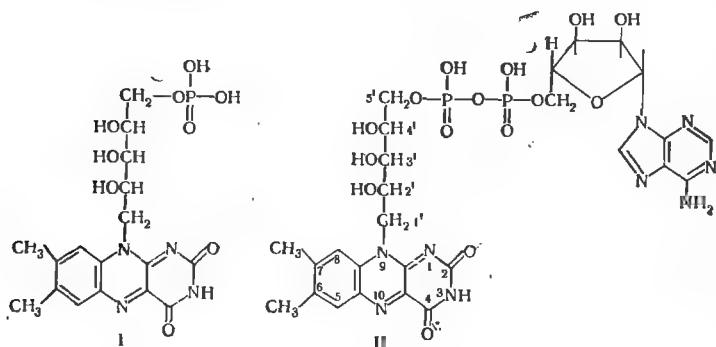
Е. Д. ХОМУТОВА

Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва

Биологическая активность флавиновых ферментов определяется способностью их кофакторов — флавинадениндинуклеотида (ФАД) или флавинмононуклеотида (ФМН) — к участию в обратимом процессе окисления — восстановления: они выполняют роль переносчиков электрона и являются частью комплексной ферментативной системы, принимающей участие в каскаде переноса электрона от субстрата на другие переносчики или на кислород.

Первый флавопротеид был открыт в 1932 г. Warburg, Cristian [1]. Было показано, что он состоит из белковой части и желтого красителя. Дальнейшими исследованиями было установлено, что желтый краситель представляет со-

бой производное витамина В₂, рибофлавина, а именно его 5'-монофосфорный эфир [1, 2]. Строение последнего было окончательно подтверждено его синтезом, осуществленным Купн в 1936 г. [3]:



Вначале открытие этого фермента рассматривалось Warburg как артефакт, однако в дальнейшем были открыты один за другим несколько десятков флавопротеидов. Некоторые из них содержат в качестве кофактора рибофлавин-5'-монофосфат, но в основном он представлен флавинадениндинуклеотидом (II).

Структура ФАД как динуклеотида была установлена гидролизом и подтверждена химическим синтезом в лаборатории Todd в 1954 г. [4].

Свойства флавиновых коферментов — ФМН и ФАД — в значительной степени определяет изоаллоксазиновый цикл. Эти соединения представляют собой окрашенные в ярко-желтый цвет вещества, обладающие интенсивной желто-зеленой флюоресценцией, хорошо растворимые в воде, растворимые в пиридине и феноле и не растворимые в большинстве органических растворителей. ФМН и ФАД имеют характерный спектр флюоресценции с максимумом при 535 нм и спектр поглощения (рис. 44) с максимумами поглощения в области 260, 375 и 450 нм [5, 6]. Следует отметить, что спектр поглощения флавиновых коферментов является чрезвычайно характерным и чувствительным (особенно в длинноволновой области) к даже незначительным изменениям в структуре и поэтому, измеряя спектр поглощения, оказывается возможным проследить за теми изменениями, которые претерпевает молекула кофермента как в обычных химических, так и в ферментативных реакциях.

Кофакторы флавиновых ферментов являются производными витамина В₂, рибофлавина — молекулы, сочетающей свойства четырех классов органических соединений: сахаров, представленных рибитильной цепью, пиримидинов, азиновых красителей и ароматических соединений.

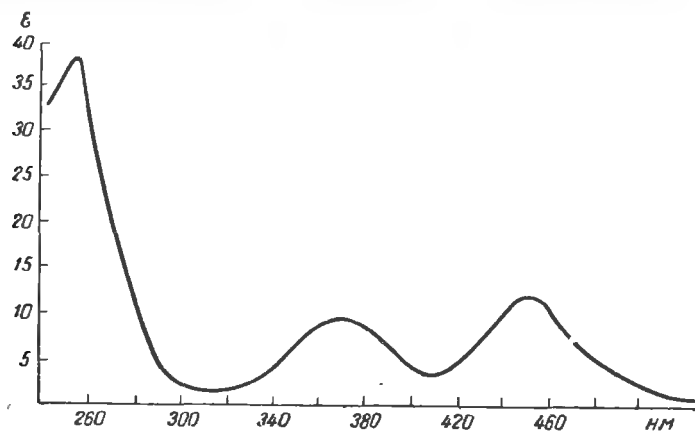
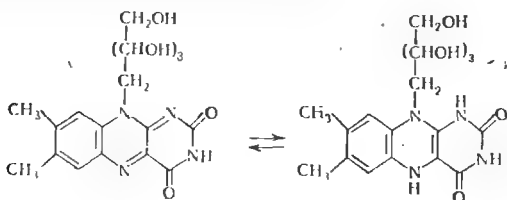


Рис. 44. Спектр поглощения ФАД.

Строение рибофлавина чрезвычайно сходно со строением нуклеозидов, лишь отсутствие гликозидной связи отличает рибофлавин от нуклеозидов, но благодаря этому молекула рибофлавина оказывается чрезвычайно устойчивой к действию кислот и даже окислителей:



Значительная часть процессов биологического окисления—восстановления связана с флавинами. Ключевыми атомами, участвующими в процессе переноса электрона, являются атомы N₁ и N₁₀ изоаллаксазинового цикла, которые способны присоединять протоны, образуя бесцветный лейкофлавин. Восстановленная форма легко переходит в окисленную под действием кислорода. За процессом окисления

и восстановления легко проследить по спектру поглощения (рис. 45) [7]. Однако флавины способны присоединять и только один электрон, давая полувосстановленный свободный флавиновый радикал, семихинон.

При полярографическом восстановлении рибофлавина в кислой среде наблюдаются две полуволны, что говорит о наличии 2 одновалентных актов восстановления [8]. Такое полувосстановление можно осуществить также дитионитом натрия [9], в кислой среде цинком [10], при интенсивном облучении видимым светом [11] и рентгеновыми лучами [12].

Изучение процесса восстановления рибофлавина и флавиномонуклеотида, проведенное в работе [13] показало, что флавиновый семихинон находится в равновесии с окисленной и восстановленной формами флавинов и что возможны две формы в зависимости от величины pH — зеленая, получившая название вердофлавин (III), и красная — родофлавин (IV) [14].

Наиболее веским подтверждением возникновения свободных радикалов при восстановлении флавинов является по-

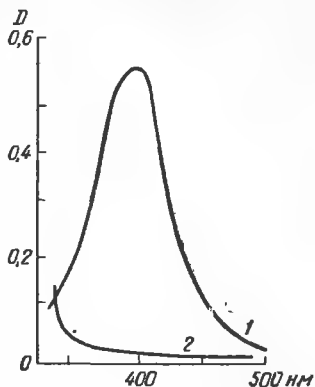
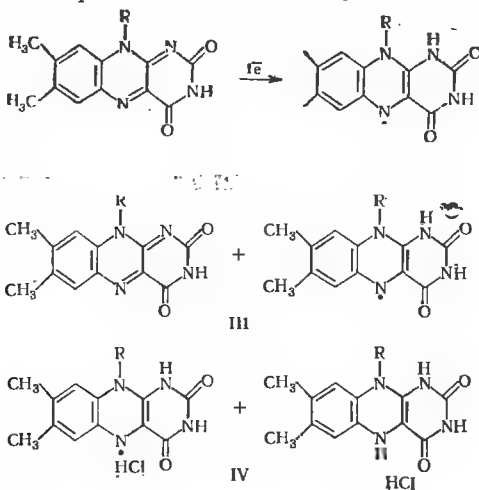


Рис. 45. Спектры поглощения.

1 — ФАД-окисленная форма; 2 — ФАД-восстановленная форма.



явление в спектре ЭПР характерного сигнала с g -фактором 2,004 [15].

Спектр поглощения, спектр ЭПР и окраска промежуточных продуктов восстановления изолированных флавиновых кофакторов очень похожи на спектры и окраску, которые обнаруживают флавопротеиды на определенной ступени

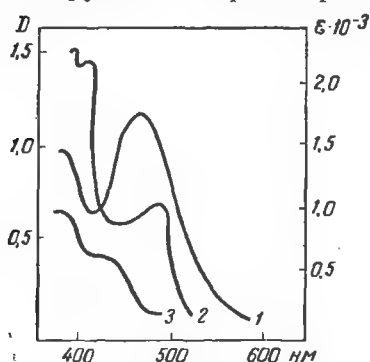


Рис. 46. Спектры поглощения.

1 — окисленная форма; 2 — семихинон-
ная форма; 3 — восстановленная форма.

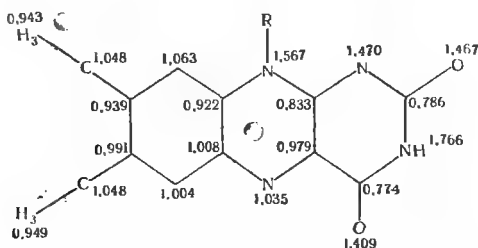
ферментативной реакции. Это заставляет предположить, что промежуточные продукты, возникающие при химическом восстановлении изолированных флавинов и при ферментативном восстановлении, имеют одинаковую структуру [16].

Так, было показано, что полученный кристаллический фермент-субстратный комплекс оксидазы D-аминокислот как в случае квази-субстрата, так и с истинным субстратом дает тот же спектр

поглощения и сигнал в спектре ЭПР, что и полувосстановленный дитионитом изолированный флавинадениндинуклеотид, являющийся кофактором этого фермента, а кристаллы такого фермент-субстратного комплекса окрашены в пурпурный цвет [17]. Изучение промежуточных продуктов в реакциях, катализируемых оксидазой D-аминокислот привело в последнее время к выделению семихинонной формы оксидазы [18]. На рис. 46 приведен спектр поглощения семихинона оксидазы, который значительно отличается от спектра окисленной и полностью восстановленной форм. Все это подтверждает возникновение семихинонного радикала флавина в процессе ферментативной реакции.

Для выяснения интимного механизма ферментативных реакций, протекающих с участием флавинов, большое значение имеет выяснение путей образования этого промежуточного семихинонного радикала, в частности вопрос о первичном месте локализации протона в изоаллоксазиновом цикле. Точных экспериментальных данных по этому вопросу пока нет, но, учитывая повышенную нуклеофильность атома азота в первом положении изоаллоксазинового цикла и исходя из данных расчета электронной плотности по мето-

ду молекулярных орбиталей в приближении Хюккеля, с достаточным основанием можно считать, что наиболее вероятным местом локализации протона является первое положение изоаллоксазина. Расчеты показывают также, что значительная часть заряда неспаренного электрона должна быть сконцентрирована в положении N₁₀ [19]. На представленной схеме приведены электронные характеристики окисленной формы изоаллоксазинового цикла ФМН или ФАД.



По поводу механизма возникновения семихинонов было высказано несколько гипотез. Наиболее простой механизм может состоять в прямом переносе электрона от субстрата на флавин [20]. Но семихиноны могут возникнуть в результате реакции флавина с радикалом, возникающим в белковой части фермента при его взаимодействии с субстратом. Такой механизм был предложен для дегидрогеназы липоевой кислоты [21]. Кроме того, флавиновые семихиноны могут возникать при образовании комплексов с переносом заряда [22]. В таких комплексах изоаллоксазиновый цикл выступает в роли акцептора электронов.

Как было отмечено, окислительно-восстановительная реакция захватывает весьма ограниченный участок молекулы флавиновых коферментов, а именно область N₁—N₁₀ изоаллоксазинового цикла. Представляется интересным рассмотреть роль других участков молекулы и вопрос о взаимном влиянии аденинового и изоаллоксазинового циклов в флавинадениндинуклеотиде.

Как флавиномононуклеотид, так и особенно флавинадениндинуклеотид являются полифункциональными молекулами. Были проведены разнообразные модификации как молекулы ФМН [23], так и молекулы ФАД [24] в изоаллоксазиновой и в адениловой частях и получено большое количество аналогов с большей или меньшей коферментной активностью.

Целесообразно остановиться на тех участках молекулы, которые оказываются существенно необходимыми для ферментативного катализа.

Одним из участков, необходимых для функционирования кофермента, является пирофосфорная связь, которая, кроме связывания с белковой частью молекулы фермента, по-видимому, нужна для поддержания необходимой для функционирования фермента конформации кофактора.

В изоаллоксазиновом цикле важным оказывается N_3 -положение, которое, вероятно, способно завязывать водородную связь с определенными участками апофермента. Изучение спектров поглощения оксидазы *D*-аминокислот и спектра поглощения модельных комплексов ФМН и ФАД [25] с фенолом говорит о том, что возможно осуществление такой связи через ОН-группу тирозина [25].

В адениновой части молекулы ФАД важную роль играет аминогруппа. Данные по ингибированию активности ФАД и данные спектров поглощения модельных соединений — аденозин-5'-моносульфата и рибофлавин-5'-моносульфата — в присутствии апофермента и без него говорят о возможном участии сульфгидрильных групп апофермента в установлении связи с кофактором и об участии в этой связи NH_2 -группы аденина. Синтезированный дезаминоаналог ФАД — флавингипоксантидинуклеотид полностью лишен коферментной активности [25]. Сам же адениновый цикл, не принимая непосредственного участия в каталитическом акте, вносит значительный вклад в создание необходимой конформации молекулы кофермента.

Далекие от реакционного центра участки молекулы — рибитильная цепь и остаток рибозы — оказывают значительное влияние на проявление коферментной активности. Для рибитильного остатка желательны наличие пятизвенной цепи и 3 вторичных гидроксильных групп и необходима *D*-конфигурация у 2'-углеродного атома [26]. В рибозном остатке даже отсутствие одной гидроксильной группы (2'-дезоксипроизводное) снижает коферментную активность такого флавиндезоксаденозиндинуклеотида в 50 раз [24]. Таким образом, соединяющий фрагмент в молекуле кофермента обладает высокой специфичностью и вполне возможно, что именно этот участок осуществляет тонкое, точное ориентирование одной части молекулы кофактора относительно другой в активном центре фермента.

Указать точно места в молекуле кофермента, ответственные за связь с субстратом, в настоящее время не представ-

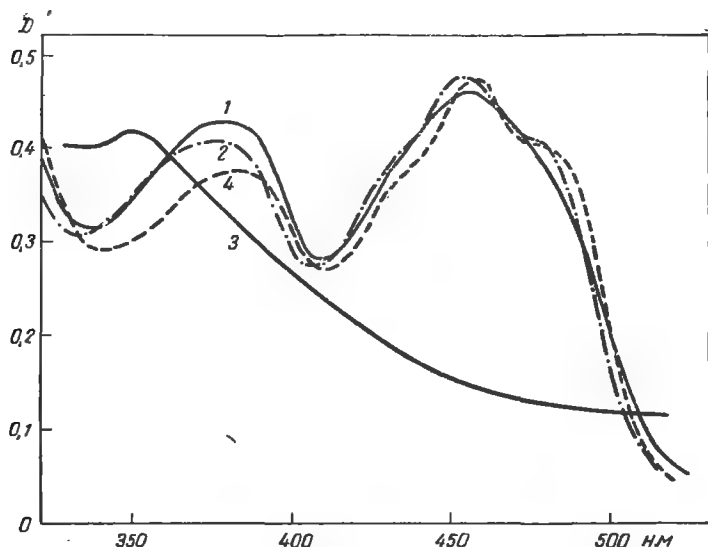


Рис. 47. Спектр поглощения холофермента оксидазы *D*-аминокислот и его комплекса с *D*-лактатом.

1 — голофермент; 2 — холофермент + *D*-лактат; 3 — холофермент + *D*-лактат, 30 минут в анаэробных условиях; 4 — холофермент + *D*-лактат.

ляется возможным. С достаточным основанием можно говорить об участии изоаллоксазинового цикла в образовании этой связи, например, на основании исследований спектра поглощения полученного Jagi и др. фермент-субстратного комплекса. На рис. 47 приведен спектр поглощения окисленной формы оксидазы *D*-аминокислот и спектр фермент-субстратного комплекса. Изменения в спектре наблюдались и в случае квази-субстрата и в случае истинного субстрата [18].

Одной из особенностей молекулы ФАД является наличие двух циклов, соединенных достаточно гибкой пирофосфорной связью. Поэтому существенное значение для химических превращений и особенно для понимания механизма катализируемых с участием флавинов ферментативных реакций имеет вопрос о конформации молекулы ФАД.

Оказалось, что в водных растворах ФАД благодаря гибкости пирофосфорной связи существует в виде внутреннего комплекса, в котором изоаллоксазиновый и адениновый циклы располагаются друг над другом. Существование такого комплекса, такого внутримолекулярного взаимодействия, проявляется в ряде свойств флавинадениндинуклеоти-

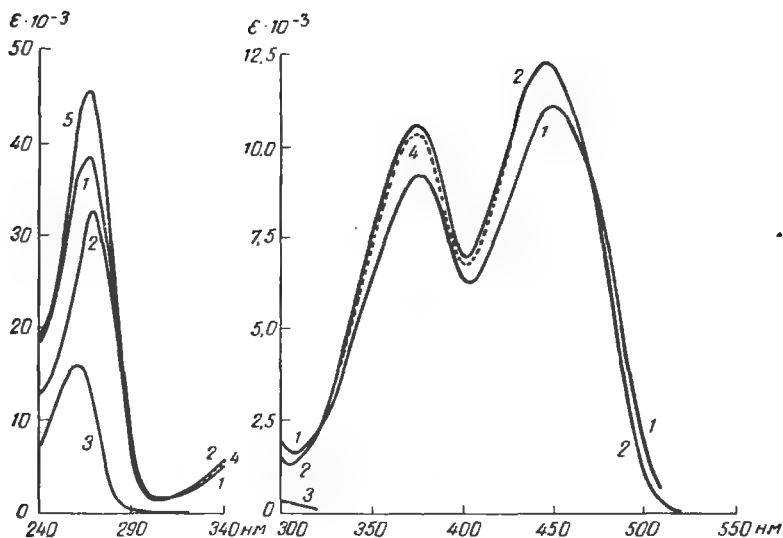


Рис. 48. Спектры поглощения.

1 — ФАД; 2 — рибофлавин; 3 — АМФ; 4 — РМФ; 5 — теоретический спектр АМФ + РМФ между 240 и 280 нм; между 290 и 510 нм 5 аналогично 4.

да: в гашении его флюоресценции по сравнению с рибофлавин-5'-монофосфорным эфиром [27], в отсутствии аддитивности молекулярной экстинкции ФАД по сравнению с величинами молекулярной экстинкции, составляющих его ФМН и аденозин-5'-монофосфата (АМФ) (рис. 48) [28]. Кривая дисперсии оптического вращения для ФАД существенно отличается от кривых дисперсии оптического вращения ФМН и АМФ (рис. 49): ФАД имеет отрицательный эффект Коттона в области 375 нм и большой положительный пик при 260 нм [29]. На рис. 50 приведены кривые дисперсии оптического вращения ФАД и эквимолекулярной смеси ФМН и АМФ. Ясно видно различие этих кривых [30].

Взаимодействие оснований во внутримолекулярном комплексе ФАД проявляется и в спектре ЯМР [31]: сигналы протонов ФАД как адениновых, так и изоаллоксазиновых сдвинуты в более сильное поле по сравнению с сигналами протонов ФМН и АМФ. Анализ данных ЯМР-спектра ФАД показывает, что бензольный цикл изоаллоксазина (область C_5) и пиримидиновый цикл аденина (область C_2) оказыва-

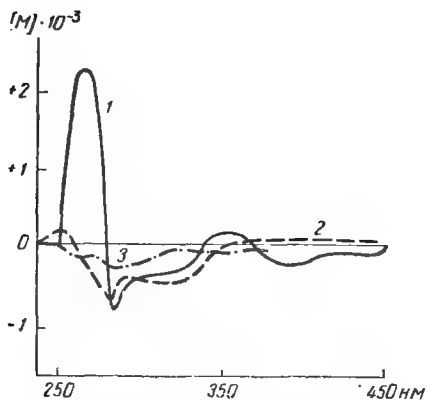


Рис. 49. Кривые дисперсии оптического вращения ФАД (1); ФМН (2) и АМФ (3).

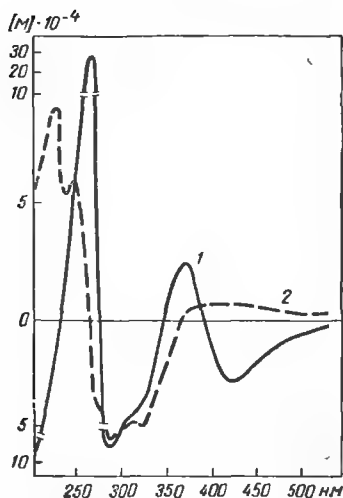


Рис. 50. Кривые дисперсии ФАД (1); ФМН+АМФ (2).

ются сближенными. Благодаря гибкости пирофосфорной связи строение такого внутреннего комплекса можно представить, как показано на рис. 51. Относительно природы такого внутреннего взаимодействия двух оснований высказывались различные предположения.

Основываясь на сильном гашении флюоресценции в ФАД, было сделано предположение о возможности образования комплекса с переносом заряда между пурином и изоаллоксазином [32]. Однако в случае переноса заряда от адениновой π -электронной системы к изоаллоксазиновой системе появление сигналов адениновых протонов в ЯМР-спектре ФАД следовало бы ожидать в более слабом поле, чем в случае АМФ. Появление сигналов адениновых протонов в спектре ФАД, наоборот, в более сильном поле ставит под сомнение возможность переноса заряда между адениновым и изоаллоксазиновым циклами.

Внутримолекулярный комплекс в ФАД пытались так же представить как донорно-акцепторный комплекс [33]. Но информация, полученная из спектров ЯМР оказалась не в пользу такого представления. Приведенные данные показывают, что флавинаденидинуклеотид в водных растворах существует в виде комплекса с вполне определенным относительным расположением циклов.

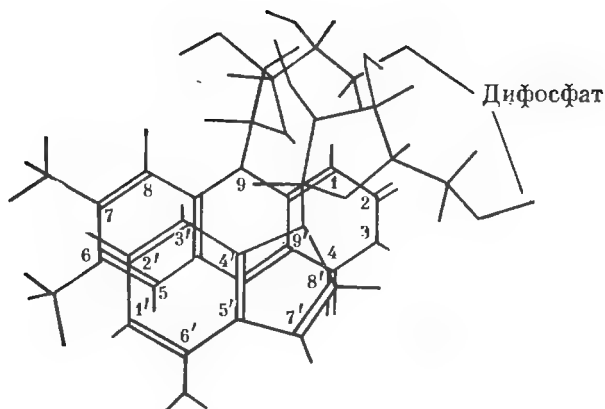


Рис. 51. Взаимодействие оснований во внутримолекулярном комплексе ФАД.

На основании данных спектра ЯМР Sarma и др. [31] считают наиболее вероятным, что взаимодействие двух циклов в молекуле ФАД носит гидрофобный характер.

Изучение влияния концентрации ФАД, ФМН и АМФ на характер спектра ЯМР показало, что ФАД способен образовывать структуры высших порядков за счет межмолекулярного взаимодействия изоаллоксазиновых циклов и что возникающая при этом структура близка к так называемой стэкинг-структуре с комплементарным расположением двух изоаллоксазиновых циклов. На рис. 52 показано возможное расположение двух изоаллоксазиновых циклов при стэкинг-взаимодействии.

Второй изоаллоксазиновый цикл находится в перевернутом положении, что облегчает взаимодействие изоаллоксазинов в областях C_8 (что следует из спектра ЯМР) и сводит к минимуму электростатическое отталкивание между карбонильными диполями.

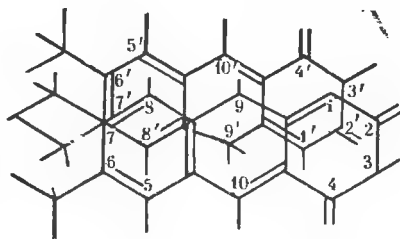


Рис. 52. Взаимное расположение двух изоаллоксазиновых циклов при стэкинг-взаимодействии.

Необходимо подчеркнуть, что существование такого внутримолекулярного взаимодействия наблюдается только в водных растворах.

В водных органических растворителях и в присутствии ароматических спиртов гашения флюоресценции ФАД не наблюдается, и флюоресценция его равна флюоресценции ФМН. Кривая дисперсии оптического вращения в таких растворах оказывается практически такой же, как и для эквимолекулярной смеси составляющих ФАД динуклеотидов [30]. Вероятно, в других растворителях (не в водных) молекула ФАД может оказываться и линейной.

Данные Sarma и др. [31] о конформации ФАД в водном растворе, подтвержденные Kotowycz и др. [34] при изучении ЯМР спектров ФАД на приборе 220 мГц, хорошо согласуются с выводами, сделанными Miles и Urry [35] при изучении спектров кругового дихроизма (КД) ФАД в сравнении с КД спектрами ФМН и рибофлавина. В водных растворах при нейтральных рН ими установлено сильное отличие КД спектра ФАД от последних двух, спектры которых близки между собой. Особенно резкое отличие КД спектров наблюдается ниже 300 нм, где для ФАД характерны две пары смежных дихроичных полос противоположного знака и почти равной интенсивности, что обусловлено взаимодействием между близкими по энергии электронными переходами в адениновом и изоаллоксазиновом циклах с непараллельными направлениями дипольных моментов переходов. Такое взаимодействие возможно только в сложной конформации, которая предполагает пространственную сближенность гетероциклических оснований и обуславливает сложность кривой КД. При удалении циклов их взаимное влияние будет уменьшаться, соответственно будет уменьшаться интенсивность полос. Действительно, при изменении условий эксперимента (прибавление органических растворителей, повышение температуры, понижение рН раствора) величина эллиптичности полос взаимно уменьшается, и КД спектр ФАД приближается к спектру ФМН. Таким образом, изучение КД спектров ФАД подтверждает наличие в водных растворах при низких температурах обратимого стэкинг-взаимодействия изоаллоксазинового и аденинового колец, которое уменьшается при уменьшении диэлектрической постоянной среды, прибавлении кислот и повышении температуры.

Voet и Rich [36] исследовали с помощью рентгеноструктурного анализа межмолекулярный кристаллический ком-

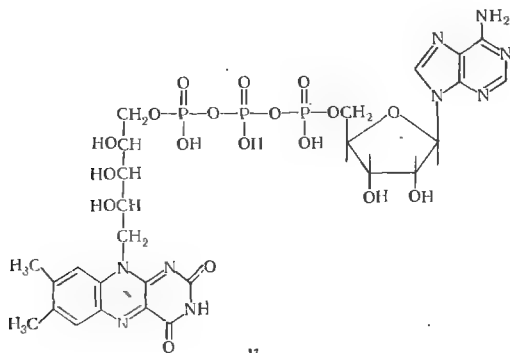
Илекс рибофлавина и 5'-бром-5'-дезоксиаденозина (1:1), взаимодействие гетероциклических колец в котором, по мнению авторов, можно рассматривать как модель внутримолекулярного взаимодействия в ФАД. Было показано, что в этом комплексе существуют две водородные связи между 6-аминогруппой и N₇ аденина и O₂ и N₃ изоаллоксазина. Две гетероциклические системы практически копланарны, среднее квадратичное отклонение атомов от плоскости 0,069 Å, максимальное 0,190 Å для C₆ рибофлавина. В кристалле обнаружено 3 молекулы воды. Рибоза находится в анти-конформации к адениновому кольцу, торзионный угол 47°. Четыре атома рибозы расположены в плоскости кольца. C_{2'}-атом отклонен в ту же сторону, что и оксиметильная группа, следовательно, рибоза имеет C_{2'}-эндо конформацию. Расстояние между плоскостями изоаллоксазинового и верхнего аденинового колец 3,54 Å, между изоаллоксазиновым и нижним адениновым кольцом 3,45 Å. Рибитильные и рибозильные группы расположены по разные стороны от стэкованных ароматических колец. Молекулы воды связаны преимущественно с рибитильными группами. Кристаллическая структура стабилизирована обширной сетью межмолекулярных водородных связей. Все кислородные атомы гидроксильных групп, рибозильных и рибитильных остатков находятся вблизи других гидроксильных групп или кислородных атомов воды. Однако нужно отметить, что ФАД отличается от исследованного кристаллического комплекса тем, что два сахарных остатка в нем связаны пирофосфорной связью, кроме того данные, полученные о конформации в кристалле нужно с большой осторожностью переносить на изучение конформации в водных растворах.

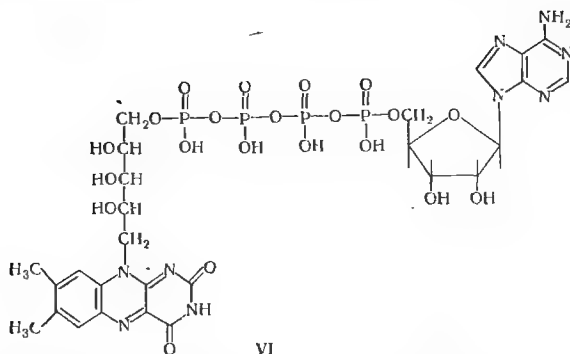
На основании изучения спектров ПМР высокого разрешения (220 мгц) и спектров ЯМР P³¹ (40,5 мгц) для ФАД, ФМН и АДФ [37] были предложены структурные модели ФАД в водном растворе, которые несколько отличаются от моделей, предложенных предыдущими исследователями. Было показано, что конформация рибитильного остатка в ФАД и ФМН идентична и подобна конформации рибитильной цепи в кристаллическом рибофлавине. Для рибозной части аденозина показано наличие равновесия между C_{3'}-эндо и C_{2'}-эндо или C_{2'}-энзо и C_{3'}-энзо конформациями, так как разница в энергии между этими конформациями мала. Для гликозидной связи была подтверждена анти-конформация. Ориентация аденинового и изоаллоксазинового

колец относительно рибозильной и рибитильной групп практически фиксирована, конформация сахарных частей остается неизменной в интервале температур 21—71°. Температурная зависимость химических сдвигов протонов показывает, что вся молекула находится в сложенной конформации, в которой адениновое кольцо расположено над изоаллоксазиновым таким образом, что их длинные оси перпендикулярны друг другу, расстояние между основаниями 3,5—4 Å.

Однако изучение драйдинговских моделей показывает, что возможно существование нескольких сложенных и открытых конформаций. На этом основании было постулировано динамическое равновесие между сложенными и открытыми формами. Переход сложенных форм в открытые и наоборот, возможно, осуществляется путем вращения каждой половины ФАД вокруг пирофосфорной связи с сохранением конформаций половин неизменными. Однако в ЯМР спектрах не удается увидеть индивидуальные сигналы отдельных конформеров, так как значение энергии стэкинг-взаимодействия для ФАД невелико и составляет около 5 ккал/моль.

Представляет интерес изучение влияния конформации молекулы на ее реакцию способность. Мы пытались подойти к этому вопросу посредством выяснения роли пирофосфатной связи в создании такой конформации молекулы ФАД. Нами были получены не описанные ранее фосфорные аналоги ФАД: флавинаденинтри-(V)- и тетрафосфаты (VI), P¹-(рибофлавин-5¹)-P¹-(аденозин-5¹) монофосфат и P¹-(рибофлавин-5¹)-P²-[аденозин-2¹(3¹)-фосфо-5¹] ди-фосфат [39].





Оказалось, что у этих соединений величина молекулярной экстинкции и интенсивность флюоресценции меньше, чем у ФАД, кривые дисперсии оптического вращения и циркулярного дихроизма значительно отличаются от таковых для ФАД, а сами они оказываются гораздо менее активными кофакторами оксидазы *D*-аминокислот, чем ФАД.

Вполне вероятно, что степень сближения двух циклов в молекуле флавинадениндукеотида в значительной степени определяется пирофосфатной связью и, по-видимому, изменение величины этой связи сказывается на ориентации одной части молекулы кофактора относительно другой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Warburg O., Cristian W. Biochem. Z., 1932, 254, 438; Naturwiss, 1932, 20, 688, 980.
2. Theorell H. Biochem. Z., 1935, 275, 344.
3. Kuhn R., Rudy H. F. Weygand., Ber., 1936, 69, 1543.
4. Kenner G., Todd A., Webb R. J. Chem. Soc., 1954, 2843.
5. Jagi K., Tabata T., Kotaki K. Vitamins (Kyoto), 1955, 8, 61; Enzymes, 1960, 2, 362.
6. Whitby L. Biochem. J., 1953, 54, 437.
7. Jagi K., Okamura K. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 159, 1.
8. Merkel J., Nickersor W. Biochim. Biophys. Acta, 1954, 14, 303.
9. Beinert H. J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 5323; Burn G. Biochim. Biophys. Acta, 1959, 31, 328.
10. Kuhn R., Wagner-Jauregg T. Ber., 1934, 67, 361.
11. Holmstrom B., Oster G. J. Am. Chem. Soc., 1961, 83, 1867.
12. Swallow A. Nature, 1955, 176, 793.
13. Okuda J., Okamura K., Jagi K. J. Biochemistry, 1966, 59, 320.
14. Nakomura S., Nakamura T., Ogure J. J. Biochemistry, 1963, 53, 143.
15. Jagi K., Osawa T. Biochim. Biophys. Acta, 1963, 67, 685; Kubo H. et al. Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 981.
16. Karreman G. Bull. Math. Biophys., 1961, 23, 55; 1961, 23, 135.
17. Jagi K., Okamura K. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1967, 146, 77.

18. Jagi K., Sugiura N. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 151, 343.
19. Пюльман Б., Пюльман А. Квантовая биохимия. М., 1965.
20. Schellenberg K., Hellerman L. J. Biol. Chem., 1958, 231, 547.
21. Massey V., Verger C. Biochim. Biophys. Acta, 1961, 48, 39; Sears R., Peters J., Sanadi D. J. Biol. Chem., 1961, 236, 2317.
22. Isenberg J., Szent-Gyorgi A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1958, 44, 857; 1960, 46, 1307; 1961, 47, 245.
23. Arsenis C., McCormick D. Biochim. Biophys. Acta, 1964, 92 (3), 440.
24. McCormick D., Chassy B., Tsibris J. Biochim. Biophys. Acta, 1964, 89, 443.
25. Jagi K. Vitamins, 1962, 25, 1.
26. McCormick D. Biochem. Biophys. Research. Commun., 1964, 14, 493.
27. Bessey O. J. Biol. Chem., 1949, 180, 755; Weber O. Biochem. J., 1950, 47, 114.
28. Whitby L. Biochem. J., 1953, 54, 437.
29. Simpson R., Vallee B. Biochim. Biophys. Research. Commun., 1966, 22, 6, 712.
30. Listowsky I., England S., Bethel J., Seifer S. Biochemistry, 1966, 5, 2548.
31. Sarma R., Dannies P., Kaplan N. Biochemistry, 1968, 7, 4359.
32. Orgel L., Phil D. Quart. Rev., 1954, 8, 422.
33. Tsibris J., McCormick D., Wright L. Biochemistry, 1965, 4, 504.
34. Kotowycz G., Teng N., Klein M., Calvin M. J. Biol. Chem., 1969, 244, 5656.
35. Miles D., Urry D., Biochemistry, 1968, 7, 2791.
36. Voet D., Rich A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1971, 68, 1151.
37. Kainosho M., Kyogoku Y. Biochemistry, 1972, 11, 741.
38. Хомутова Е. Д., Шапиро Т. А., Березовский В. М., ЖОХ, 1970, 40, 470.
39. Шапиро Т. А., Хомутова Е. Д., Березовский В. М., ЖОХ, 1972, 42, 1634.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЛАВИНОВЫХ ФЕРМЕНТОВ

А. А. ГЛЕМЖА

Университет имени В. Капсукаса, Вильнюс

Флавопротеиды составляют весьма обширную группу окислительно-восстановительных ферментов, окисляющих самые различные субстраты и переносящих водород на различные акцепторы. Это оксидазы, окисляющие субстраты посредством молекулярного кислорода с образованием перекиси водорода, дегидрогеназы, переносящие электроны от субстратов на цитохромы или искусственные акцепторы электронов, дегидрогеназы, восстанавливающие никотиновые коферменты и диафоразы, окисляющие восстановленные никотиновые коферменты и диафоразы, окисляющие восстановленные никотиновые коферменты посредством искусственных акцепторов электронов. Наличие столь обширного количества разнообразных субстратов и акцепторов водорода, большое разнообразие происходящих процессов,

а также структурное разнообразие не позволяет детально обсудить все вопросы, связанные с действием флавиновых ферментов. Этим вопросам был посвящен симпозиум, материалы которого довольно детально отражают положение дел в области исследования флавиновых ферментов [1]. К тому же за последние годы появилось несколько обзоров, посвященных флавопротеинам [2, 3, 4]. В связи с этим мы будем обсуждать только некоторые вопросы, касающиеся действия флавиновых ферментов: вопросы структурной организации, кинетического подхода при идентификации промежуточных продуктов реакции и природы этих промежуточных продуктов, используя в основном данные, полученные для наиболее изученных флавопротеидов.

Структура флавопротеидов

В составе флавиновых ферментов находится либо ФАД, либо ФМН, и только в дигидрооротатдегидрогеназе (КФ 1.3.3) и ФАД и ФМН [5]. В табл. 11 приводятся молекулярные веса, количество флавина и другие предполагае-

Т а б л и ц а 11

Характеристика некоторых флавиновых ферментов

Название фермента	Молекулярный вес	Количество флавина на 1 моль	Предполагаемые группы активного центра	Литература
Оксидаза <i>D</i> -аминокислот (КФ 1.4.3.3)	100 000	2 ФАД	Имидазол	[4]
Оксидаза <i>L</i> -аминокислот (КФ 1.4.3.2)	130 000	2 ФАД	Имидазол	[4,6]
Липоамиддегидрогеназа (КФ 1.6.4.3)	100 000	2 ФАД	Дисульфид	[7,8]
Глутатионредуктаза (КФ 1.6.4.2)	110 000	2 ФАД	Дисульфид	[9,10]
Тиоредоксинредуктаза	78 000	2 ФАД	Дисульфид	[11]
Ксантиноксидаза (КФ 1.2.3.2)			Mo, Fe, сера	[12]
Альдегидоксидаза (КФ 1.2.3.1)	280 000	2 ФАД	Co, Fe, сера	[13]
Дигидрооротатдегидрогеназа (КФ 1.3.3.1)		1 ФМН и 1 ФАД	Fe, сера	[5]
Сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.99.1)	120 000	2 ФАД	Fe, сера	[14]
Моноаминоксидаза (КФ 1.4.3.4)	100 000	1 ФАД		[15]
То же	130 000	2 ФАД		[16]
Глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4)	153 000	2 ФАД		[17]

мые компоненты активного центра ферментов для наиболее изученных флавопротеидов.

Как видно из табл. 11, во многих случаях флавопротеиды имеют молекулярный вес порядка 100 000 и в молекуле фермента находятся две молекулы флавина. Реже встречаются флавопротеиды с молекулярным весом меньше или больше 100 000.

Связь флавина с белком обычно довольно стабильна, и при очистке ферментов флавин от апофермента не отделяется. Однако еще в 1938 г. Warburg, Christian отделили ФАД от оксидазы *D*-аминокислот, переосаждая фермент в кислой среде серноокислым аммонием, доказав тем самым, что флавин связан с белком нековалентной связью [18]. Этот метод позволил разрушить большинство флавиновых ферментов. При этом флавин отделяется в достаточно мягких условиях и не нарушается нативность апофермента. При добавлении кофермента извне почти полностью восстанавливается исходная ферментативная активность. Правда, для таких ферментов, как сукцинатдегидрогеназа, ксантиноксидаза, лактатдегидрогеназа (КФ 1. 1. 2. 3), флавопротеидный комплекс в кислой среде не разрушается. Флавин удается отделить от белка только при помощи переваривания протеолитическими ферментами, и при этом апофермент претерпевает необратимые изменения [19, 20]. В этих случаях, вероятно, имеется ковалентная связь между белком и флавином. Для сукцинатдегидрогеназы давно предполагалось существование пептидной связи между белком и ФАД [21]. Свойства ФАД-пептида, полученного из этого фермента, обсуждались Napasi и др. [22]. Однако в одной из последних работ Singer и др. [23] представлены данные, доказывающие, что ФАД связывается с белком посредством эфирной связи, с участием в ней восьмого углерода диметилизоаллоксазинового кольца.

Для большинства флавопротеидов ковалентные связи между флавином и белком, по всей вероятности, отсутствуют. Однако в этих случаях взаимодействие флавина с белком является, по-видимому, многоточечным. Работа по реконструкции цитохром- b_5 -редуктазы из ФАД и апофермента, проведенная Strittmatter [24] показала, что при присоединении флавина к белку происходят какие-то конформационные изменения в структуре белка. Вслед за этим, Massey, Curti [25] исследовали оксидазу *D*-аминокислот. Они определили, что взаимодействие флавина с белком имеет 2 стадии: быструю биомолекулярную и медлен-

нию мономерно-молекулярную. Ферментативная активность восстанавливается синхронно со вторым процессом, характеризующимся медленным изменением спектра абсорбции и гашением флюоресценции. Таким образом, можно полагать, что сперва происходит быстрое присоединение флавина к белку (при этом меняется поляризация флюоресценции) с образованием неактивного комплекса, а потом — медленные изменения в структуре белка, обусловленные образованием дополнительных связей с флавином, ведущие к возникновению активной конфигурации фермента.

Kalse, Veeger [26], исследуя механизм воссоединения ФАД с аполипоамиддегидрогеназой, отметили, что при низкой температуре (5°) флавин соединяется с белком, но при этом восстанавливается только неспецифическая диафоразная активность. Она в несколько раз превышает диафоразную активность нативного фермента, однако истинная активность практически отсутствует. Если после этого повысить температуру до 20°, то начинается медленное восстановление истинной активности, которая через 30 минут достигает 90% от исходной активности нативного фермента. Диафоразная активность при этом понижается до нормальной величины нативного фермента. При этом, как видно из данных [27], происходят заметные изменения в структуре белка. Две молекулы апофермента, имевшие молекулярный вес 50 000 (т. е. в 2 раза меньше молекулярного веса нативного фермента), объединяются, образуя активный фермент с молекулярным весом 100 000.

Swoboda [17], исследуя апофермент глюкозооксидазы, отметил, что при отщеплении ФАД значительная часть апофермента (80%) имеет пониженную константу седиментации (равную 4,5 S против 8,0 S для нативного фермента), хотя молекулярный вес остается постоянным (153 000). При этом значительно изменяется стабильность белка к действию проназы и тепловой инактивации. Очевидно, при отщеплении ФАД происходят значительные изменения в структуре апофермента. При добавлении ФАД все эти изменения исчезают и полностью восстанавливается как исходная структура, так и активность фермента. Следует отметить, что частичное восстановление исходной структуры идет и тогда, когда вместо ФАД к апоферменту добавляется АДФ, хотя ферментативная активность при этом, конечно, не восстанавливается [28]. Это свидетельствует о важной роли адениловой части ФАД в образовании его комплексов с белками. Исследуя кинетику восстановления

активности, поляризации и гашения флюоресценции и изменения оптической плотности, Swoboda пришел к выводу, что процесс воссоединения флавина с белком состоит из двух стадий [17, 28]. Быстрое присоединение флавина к белку идет за счет образования связи между адениловой частью ФАД и молекулой белка. При этом восстанавливается исходная конфигурация белка, однако ферментативная активность не появляется. После этого происходит взаимодействие диметилизоаллоксазинового кольца с какими-то функциональными группами белка, сопровождаемое гашением флюоресценции и увеличением оптической плотности. При этом восстанавливается ферментативная активность.

Таким образом мы видим, что есть много общего в механизме присоединения флавина к белку для различных флавопротеидов. Во всех разобранных случаях мы имеем двухстадийный процесс, который может быть записан в виде следующего уравнения:



Первая стадия — быстрая, бимолекулярная, с константой скорости 10^5 — 10^6 $\text{М}^{-1} \text{мин}^{-1}$ — ведет к появлению неактивного или малоактивного фермента. Вторая стадия — медленная, мономолекулярная, с константой скорости $0,2 \text{ мин}^{-1}$ — обусловлена конформационными изменениями в структуре белка, превращающими неактивный фермент в активный [17].

Важную роль в связывании флавина с белком играет адениловая часть молекулы ФАД. В работе Swoboda [28] было показано, что только такие вещества, в составе которых имеются аденин, рибоза и фосфорная кислота (АДФ, АТФ, АМФ, АДФ-рибоза), могут конкурировать с ФАД за место на белке. Важны все три части. Замена аденина на любое другое основание, удаление фосфорной кислоты или рибозы и фосфорной кислоты полностью лишает соединение возможности взаимодействовать с белком. Наиболее важной считается связь между фосфорной кислотой, которая содержит отрицательно заряженные группы, и положительными группами белка. Видимо, разрыв этой связи в кислой среде и способствует диссоциации флавина.

Кроме адениловой части молекулы, в связывании флавина участвует и диметилизоаллоксазиновое кольцо. В некоторых случаях оно образует стабильные ковалентные связи [14, 21, 23], однако в большинстве флавиновых ферментов

это, вероятно, водородные или вандерваальсовы взаимодействия, или комплексы с переносом заряда. Исходя из данных, полученных с оксидазой *D*-аминокислот, авторы работы [29] предположили, что в образовании связи между белком и флавином важную роль играет 3-й азот диметилизоаллоксазинового кольца. Введение заместителей в положение 3 мешало присоединению такого аналога ФАД к апоферменту. Работа [30] показала, что в случае липоамиддегидрогеназы блокирование ФАД в третьем положении посредством *N*-метилирования или карбоксиметилирования хотя и снижает возможность присоединения аналога ФАД к белку, но весьма незначительно. Диафоразная активность восстанавливается почти до такой же величины, как и в присутствии ФАД. Однако восстановление истинной липоамиддегидрогеназной активности происходило весьма незначительно, несмотря на то что шло медленное изменение оптической плотности, характерное для второй стадии процесса. Видимо, аналоги ФАД полностью не могли заменить ФАД во второй стадии процесса. Эти данные согласуются с предположением Swoboda [28] о том, что первая стадия взаимодействия ФАД с апоферментом обусловлена реакцией адениловой части с белком. Небольшие изменения в диметилизоаллоксазиновом кольце в этом случае не имеют значения. В то же время вторая стадия, где происходит присоединение кольца к молекуле белка, не может нормально проходить из-за изменения электронной плотности у третьего атома азота. О том, что третий атом азота участвует в образовании связи с белком, свидетельствует и изменение его константы диссоциации. В свободном ФАД pK равно 10,2, а в ферменте повышается до 12,0 или больше [28].

Как мы уже отмечали, связывание флавина с белком сопровождается значительным уменьшением флюоресценции и изменением оптических свойств (сдвигом максимумов абсорбции, изменением их абсолютной величины). Это свидетельствует об образовании сложных, многообразных связей между белком и флавином, в которых, вероятно, участвуют различные компоненты диметилизоаллоксазинового кольца.

В металлофлавопротеидах создаются дополнительные связи за счет имеющихся в молекуле фермента ионов металла. Авторы работы [12] отмечают, что с увеличением количества металла в молекуле белка значительно меняются максимумы абсорбции. Для таких ферментов, как

липоамиддегидрогеназа или глутатионредуктаза, присоединение флавина к белку сопровождается увеличением флюоресценции. Однако это несоответствие с другими флавопротеидами можно истолковать следующим образом. Свободный ФАД в растворе имеет внутримолекулярный комплекс между кольцом аденина и диметилизоаллоксазина, наличие которого понижает его флюоресценцию по сравнению с ФМН. В процессе его присоединения к белку внутренний комплекс может разрушаться, а образующийся комплекс с белком слабее внутреннего, и в итоге флюоресценция увеличивается.

Исходя из приводимых данных, можно сказать, что, несмотря на определенные различия, есть много общего в структурной организации флавопротендов. Во-первых, двухстадийная реакция соединения флавина с белком. Во-вторых, многогранность связи между флавином и белком. В-третьих, явная структурная функция флавина в молекуле флавиновых ферментов.

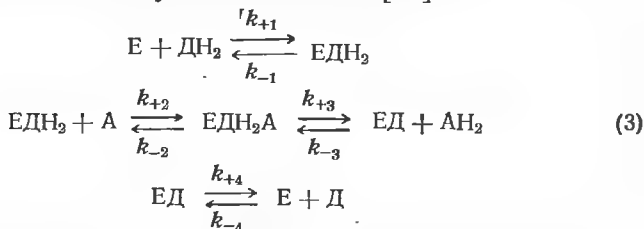
Кинетическая характеристика реакций, катализируемых флавопротеидами

Все реакции, катализируемые флавиновыми ферментами, бимолекулярны. В общем случае они могут быть описаны следующим уравнением:



$ДН_2$ — донор водорода, $А$ — его акцептор.

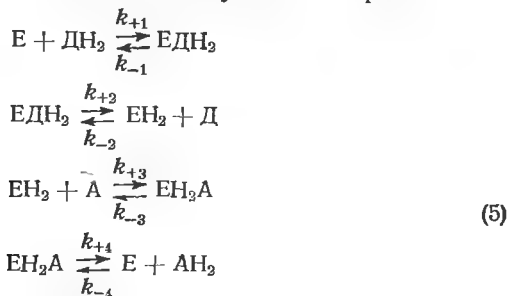
Принимая ряд упрощений (определенная последовательность присоединения субстратов, минимальное количество промежуточных фермент-субстратных комплексов), эту реакцию можно описать следующими 2 различными группами уравнений. Первая из них предполагает образование тройного промежуточного фермент-субстратного комплекса и описывается следующим образом [31]:



В этом случае начальная скорость прямой реакции определяется уравнением:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_{\text{ДН}_2}}{[\text{ДН}_2]} + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_{\text{ДН}_2 A}}{[\text{ДН}] [A]}} \quad (4)$$

Если в процессе ферментативного катализа не образуется тройной фермент-субстратный комплекс, а только двойные, то в таком случае последовательность происходящих превращений может быть описана следующим образом:



В этом случае начальная скорость прямой реакции описывается уравнением

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_{\text{ДН}_2}}{[\text{ДН}_2]} + \frac{K_A}{[A]}} \quad (6)$$

Различия между этими механизмами легко прослеживаются при измерении скорости реакции в зависимости от концентрации одного субстрата при различных постоянных концентрациях другого субстрата. Можно показать при помощи несложных преобразований, что уравнения (4) и (6) превращаются соответственно в (7) и (8):

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \cdot \frac{K_A}{[A]} + \frac{1}{[\text{ДН}_2]} \left(\frac{1}{V} + \frac{K_{\text{ДН}_2}}{V} + \frac{K_{\text{ДН}_2 A}}{V \cdot [A]} \right) \quad (7)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \cdot \frac{K_A}{[A]} = \frac{1}{[\text{ДН}_2]} \left(\frac{1}{V} + \frac{K_{\text{ДН}_2}}{V} \right) \quad (8)$$

Если полученные экспериментальные данные отложить в графике $1/v$ от $1/[\text{ДН}_2]$, то мы получим прямую. В случае механизма с образованием тройного фермент-субстратного комплекса, при различных концентрациях второго субстрата $[A]$, прямые будут иметь различный наклон, так как по уравнению (7) концентрация субстрата A входит в величину, определяющую угол наклона прямой. В случае двойных фермент-субстратных комплексов наклон всегда будет одинаковым.

На рис. 53 и 54 приводятся данные, полученные Massey, Williams для глутатионредуктазы и нами для липоамиддегидрогеназы [10]. Параллельность прямых свидетельствует в пользу механизма с участием двойных фермент-субстратных комплексов. В то же время данные [32] для оксидазы *L*-аминокислот (рис. 55) и [33] для оксидазы *D*-аминокислот показывают, что прямые имеют различный наклон, что соответствует механизму с образованием тройного фермент-субстратного комплекса. В некоторых случаях когда член K_{DH_2A}/V имеет небольшой удельный вес, наклон прямых при разных концентрациях второго субстрата может быть незначительным, и полученные прямые будут выглядеть параллельными. Его значение может быть увеличено в присутствии конкурентных ингибиторов. Таким образом, для сукцинатдегидрогеназы было доказано образование тройного комплекса. Исследование скорости реакции в присутствии малоната [34] свидетельствует в пользу образования тройного фермент-субстратного комплекса (рис. 56).

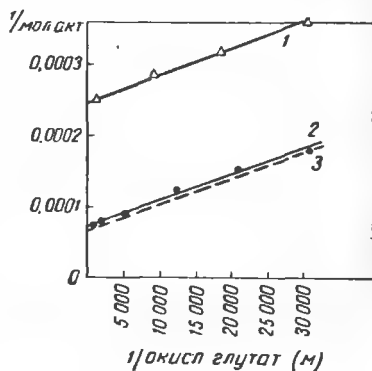
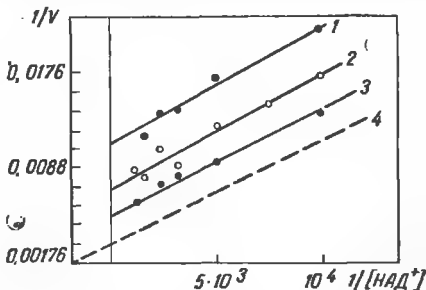


Рис. 53. Глутатионредуктаза. Зависимость скорости реакции от концентрации окисленного глутатиона (GSSG) при различных концентрациях НАДФН.

1 — $1,43 \cdot 10^{-6}$ М; 2 — $8,5 \cdot 10^{-6}$; 3 — ∞ [10].

Рис. 54. Липоамиддегидрогеназа. Зависимость скорости реакции от концентрации НАД⁺ при различных концентрациях дигидролипоевой кислоты.

1 — $8 \cdot 10^{-4}$ М; 2 — $2,4 \cdot 10^{-3}$ М;
3 — $3,2 \cdot 10^{-3}$ М; 4 — ∞ .



Данные кинетических исследований, хотя и немногочисленные, позволяют предположить наличие двух отличающихся друг от друга механизмов ферментативного катали-

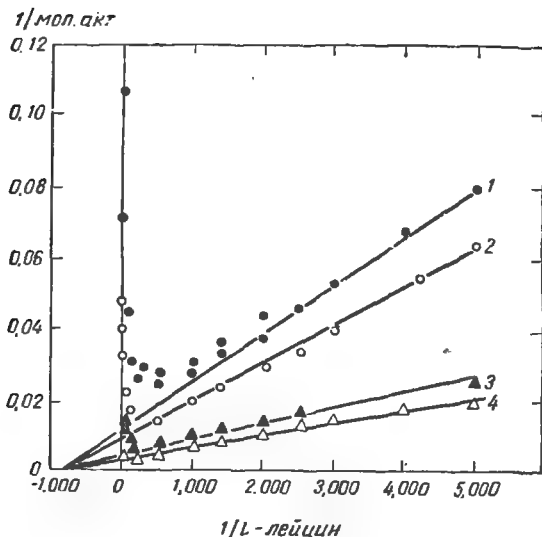


Рис. 55. Оксидаса *L*-аминокислот. Зависимость скорости реакции от концентрации *L*-лейцина (*S*) при различных концентрациях кислорода.

1 — 6% O_2 , 95% N_2 ; 2 — 10% O_2 , 90% N_2 ; 3 — 20% O_2 , 80% N_2 ; 4 — 100% O_2 [32].

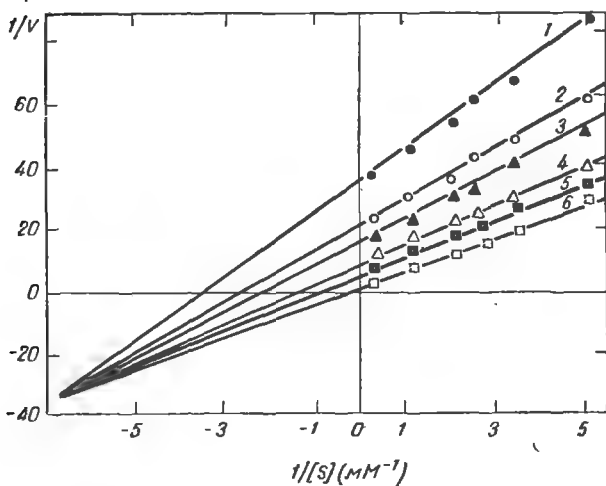


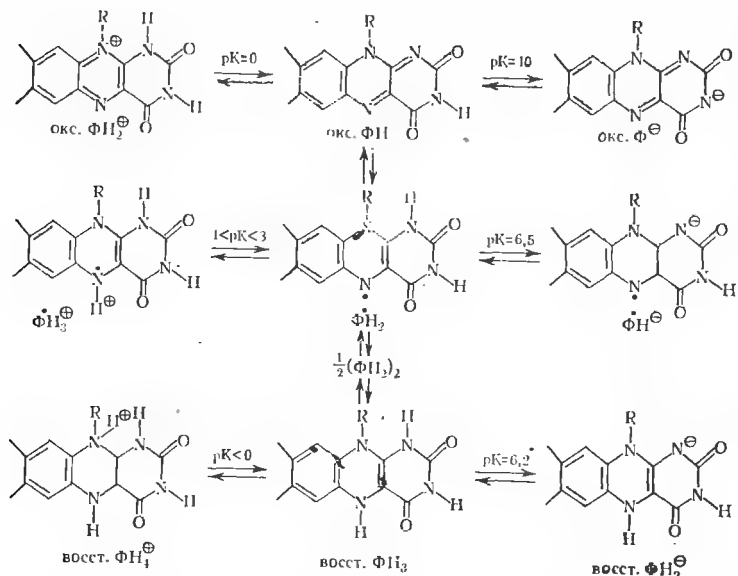
Рис. 56. Сукцинатдегидрогеназа. Зависимость скорости реакции от концентрации сукцината (*S*) в присутствии малоната (67 мкмоль) при различных концентрациях феррицианида.

1 — 0,2 мМ; 2 — 0,4 мМ; 3 — 0,6 мМ; 4 — 1,0 мМ; 5 — 3,0 мМ; 6 — 5,0 мМ [34].

за. С другой стороны, кинетические исследования подтверждают возможность существования нескольких промежуточных состояний флавина в каталитическом акте. Природа этих промежуточных соединений обсуждается ниже.

Природа промежуточных продуктов реакции

Флавины обладают способностью участвовать в обратимых окислительно-восстановительных процессах. Известно три окислительно-восстановительных состояния флавинов:



окисленная форма — хинон, полувосстановленная форма — семихинон и полностью восстановленная форма — гидрохинон. Каждая из этих форм в зависимости от среды может быть нейтральной, катионом или анионом. Выше приводятся структуры и условия перехода одной формы в другую.

Все формы флавина различаются между собой по спектрам поглощения, поэтому они могут быть идентифицированы.

Однако, когда флавин соединен с белком, его спектр значительно меняется. К тому же флавиновые ферменты, кроме флавина, содержат в активном центре и другие важные группы, поэтому полученные данные не всегда удается до-

Максимумы оптического поглощения разных форм флавина (по [2])

Соединение	$\lambda_{\text{макс}}$, нм
окс-ФН ₂ ⁺	390, 264, 222
окс-ФН	446, 370, 270, 230
окс-Ф ⁻	444, 350, 270, 230
Ф·Н ₃ ⁺	488, 358, 258
Ф·Н ₂	622, 590 (плечо), 570
Ф·Н ⁻	612 (?)
1/2 (ФН ₂) ₂	800
вост-ФН ₄ ⁺	316, 250
вост-ФН ₃	400 (плечо), 280 (плечо), 250
вост-ФН ₂ ⁻	350 (плечо), 288, 256

статочно однозначно интерпретировать и определить возможную структуру промежуточных продуктов. В связи с этим мы рассмотрим три типа флавиновых ферментов.

В первую группу мы включили липоамиддегидрогеназу, глутатионредуктазу и тиоредоксинредуктазу. Все они имеют молекулярный вес около 100 000, содержат две молекулы ФАД в молекуле фермента, а в активном центре имеется дисульфидный мостик.

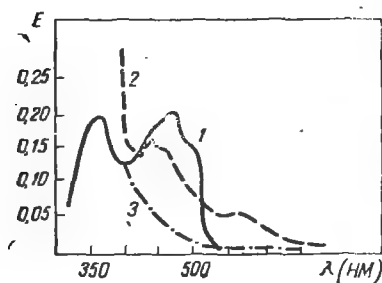


Рис. 57. Спектры абсорбции липоамиддегидрогеназы.

1 — окисленная форма; 2 — семихинон;
3 — полностью восстановленная форма [7].

Рядом авторов было показано, что липоамиддегидрогеназа в окисленном состоянии характеризуется спектром абсорбции с максимумами при 355 и 455 нм, что весьма близко к формам окс-ФН и окс-Ф⁻ [7, 35, 36]. Как видно из рис. 57, при добавлении к ферменту восстановливающего субстрата (НАДН) спектр абсорбции меняется. Максимум при

455 нм уменьшается и сдвигается в сторону более коротких волн. Появляется новая полоса абсорбции в области 500—600 нм с максимумом при 530 нм. Спектр этого полувосстановленного флавина ближе всего спектру семихинона Ф·Н₂. Недавно Massey, Palmer [37] установили, что идентичный семихинон получается и при облучении

липоамиддегидрогеназы в анаэробных условиях в присутствии ЭДТА. Полученный семихинон изучали при помощи ЭПР, и было установлено, что он является свободным радикалом. При продолжительном контакте липоамиддегидрогеназы с избытком НАДН в низкой температуре или в присутствии блокаторов сульфгидрильных групп полувосстановленная форма фермента медленно исчезает и флавин полностью восстанавливается. При этом полностью исчезает поглощение при 530 нм. В некоторых случаях получается полностью восстановленная форма липоамиддегидрогеназы, которая имеет полосу поглощения при длинных волнах (выше 700 нм).

В работе [35], используя технику быстрого перемешивания, определяли скорость образования и окисления получаемого семихинона при помощи липоевой кислоты и липоилглицина и сравнивали ее со скоростью каталитического окисления НАДН теми же субстратами. На рис. 58 приводятся их данные, которые показывают, что имеется хорошая корреляция между этими двумя процессами для обоих окислительных субстратов. Основываясь на этом, авторы считают семихинонную форму липоамиддегидрогеназы истинным промежуточным продуктом реакции. К тому же при полном восстановлении липоамиддегидрогеназа теряет активность и не может быть окислена субстратами, а только молекулярным кислородом. Она, по-видимому, не играет роли в ферментативном процессе. Таким образом, в липоамиддегидрогеназе флавин восстанавливается только до семихинона, захватывая один водород и при этом, по всей вероятности, возникает $\Phi \cdot H_2$. Второй водород должен поглощаться белком.

Исследование роли сульфгидрильных групп в образовании промежуточных продуктов реакции показало, что наряду с восстановлением флавина разрушается дисульфид-

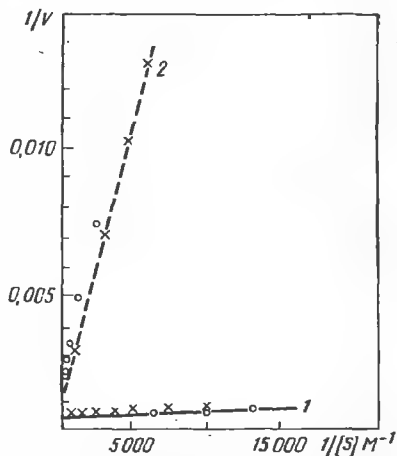


Рис. 58. Липоамиддегидрогеназа. Сопоставление скорости окисления НАДН (x) со скоростью окисления семихинона (o).

1 — окислитель липоилглицин; 2 — окислитель липоевая кислота [35].

ный мостик белка с образованием сульфгидрильных групп. Определение свободных сульфгидрильных групп, проведенное рядом авторов [38—41], позволило установить, что при восстановлении фермента их количество увеличивается приблизительно на 2 моля в расчете на 1 моль флавина. В связи с этим была выдвинута следующая схема, отража-

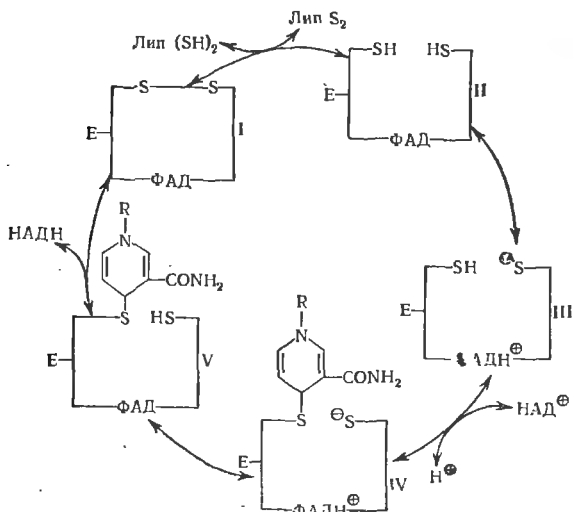


Рис. 59. Предполагаемая схема действия липоамид-дегидрогеназы по Мэссу [36].

I — окисленная форма фермента; II и V — фермент с восстановленным дисульфидным мостиком; III и IV — фермент, содержащий флавиновый семихион.

ющая действие липоамиддегидрогеназы (рис. 59). Когда фермент находится в контакте с НАДН, образуются флавиновый семихион, 1 сульфгидрильная группа и свободный радикал серы. Это состояние фермента находится в равновесии с состоянием, где есть 2 сульфгидрильные группы и окисленный ФАД. Поэтому при титровании сульфгидрильных групп и получается, что их количество увеличивается на 2 моля в расчете на 1 моль ФАД. С другой стороны, данные [42] показывают, что в свободнорадикальном состоянии находится лишь около 10% всего ФАД. Это свидетельствует о наличии других форм флавина, либо о существовании какой-то связи между свободным радикалом флавина и серы,

Изучение механизма действия глутатионредуктазы [10] показало, что имеется почти полная аналогия с липоамиддегидрогеназой. В то же время тиоредоксинредуктаза, которая тоже очень напоминает липоамиддегидрогеназу по своей структуре, по-видимому, действует по-иному. Семихинон типа $\Phi \cdot H_2$, получаемый посредством иррадиации, не

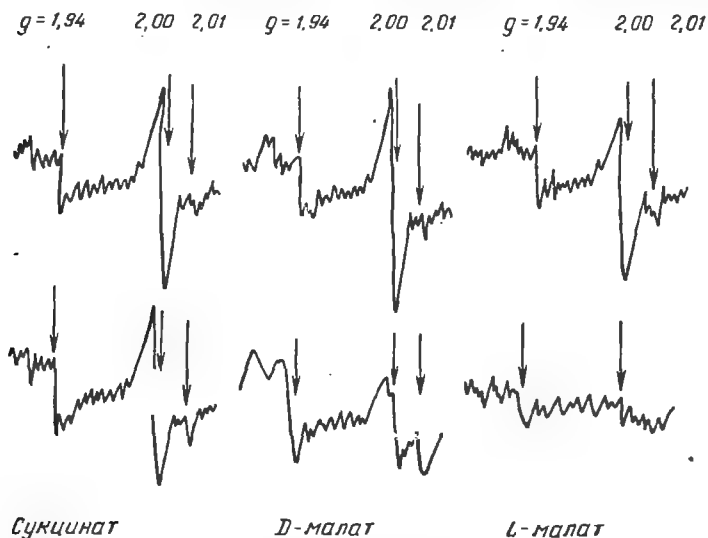


Рис. 60. Спектр сукцинатдегидрогеназы, преинкубированной с сукцинатом [34].

восстанавливает дисульфидных связей [43], он полностью неактивен. При контакте фермента с восстанавливающим субстратом флавин восстанавливается полностью, а потом окисляется и восстанавливает дисульфидный мостик белка [11].

Во вторую группу мы объединили все металло-флавопротеидные ферменты. Это сукцинатдегидрогеназа, ксантиноксидаза, дигидрооротатдегидрогеназа и альдегиддегидрогеназа. Всем им свойственно наличие в составе фермента наряду с флавином негемового железа и «кислотолабильной» серы. Ксантиноксидаза [12] и альдегидоксидаза [13] в своем составе имеют молибден. Как и в других флавопротеинах, в этих ферментах флавин играет роль переносчика водорода. При инкубации сукцинатдегидрогеназы с янтарной кислотой [34], дигидрооротатдегидрогеназы с

НАДН [12] значительно понижается оптическая плотность при 460 нм, что свидетельствует о восстановлении флави-на. Наряду с изменением оптической плотности при 460 нм появляется сигнал в спектрах ЭПР с $g=2,0$, свидетельствующий об образовании свободнорадикального семихинона флавиона [34, 35]. Вместе с сигналом, типичным для фла-

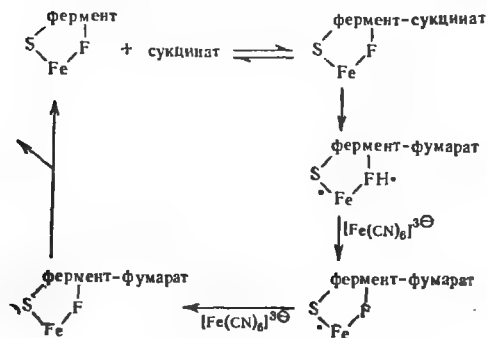


Рис. 61. Предполагаемая схема действия сукцинатдегидрогеназы [34].

винового семихинона, появляется и сигнал восстановленного железа $g=1,94$. Он также характерен для всех металло-флавопротеинов. Интересно отметить, что он может быть получен и тогда, когда в молекуле фермента отсутствует флавин [46, 47]. В случае сукцинатдегидрогеназы, спектр ЭПР которой приводится на рис. 60, есть и еще один сигнал $g=2,01$. Его возникновение, по мнению авторов работы [34], обусловлено делокализацией электрона в железосерном комплексе фермента. Они предлагают следующую схему действия сукцинатдегидрогеназы (рис. 61). В активном центре фермента имеется тройной комплекс, образованный серой, железом и флавином. Он и принимает 2 восстанавливающих эквивалента. При этом флавин восстанавливается одним эквивалентом с образованием семихинона, а второй захватывается железосерным компонентом комплекса, где тоже образуется свободный радикал, дающий двойной сигнал. Между этими свободными радикалами, очевидно, существует взаимодействие типа комплексов с переносом заряда. Если такой комплекс превращается в настоящий, то сигнал в спектре ЭПР исчезает [48]. Свободнорадикальная форма флавина и в случае металло-флавопротеинов, вероятно, не является единственной. По данным работы [45], в случае альдегиддегидрогеназы в свободнорадикальной форме находится лишь 25% всего фла-

вина, 25% железа и 15—20% молибдена. Это всего $\frac{1}{4}$ часть всех коферментов. Видимо, и тут могут существовать состояния с полностью окисленной и полностью восстановленной формами флавина. В случае ксантиноксидазы и дигидрооротатдегидрогенезы Massey и др. большую роль приписывают «кислотолабильной» сере [5, 12]. По их мнению, сера может захватывать как 1 электрон с образованием свободного радикала, так и 2, и при этом флавин окисляется.

В 3-ю группу мы отнесли оксидазы L^0 - и D -аминокислот. Они имеют одинаковый молекулярный вес, близкие субстраты, идентичный кинетический механизм действия, в обоих предполагается наличие в активном центре имидазола. При добавлении субстратов оксидазы- L^0 - и D -аминокислот претерпевают аналогичные с другими флавопротеидами спектральные изменения. Абсорбция в области 380—460 нм уменьшается, и появляется широкая полоса поглощения в области 530—600 нм. Этот полувосстановленный фермент может быть окислен добавлением кислорода и, таким образом, является кинетически важным [4]. Однако в противоположность липоамиддегидрогеназе этот семихинон не получается при искусственном восстановлении фермента дитионитом или при облучении в присутствии ЭДТА [37]. При искусственном восстановлении оксидаз аминокислот появляется частично восстановленная форма флавина, которая характеризуется полосой поглощения в области 370—390 нм, по величине близкой к окисленной форме фермента, слабой полосой в области 470—490 нм и очень незначительной абсорбцией в области 550—600 нм. На рис. 62 приведены спектры поглощения окисленной формы оксидазы D -аминокислот и семихинона, полученного искусственным путем. Как видно на рис. 62, этот семихинон значительно отличается от семихинона липоамиддегидрогеназы (рис. 57). К тому же он значительно медленнее окисляется, чем полувосстановленная форма, полученная при помощи субстрата [32]. Различаются эти две формы и по спектрам ЭПР. Искусственный семихинон дает сигнал свободного

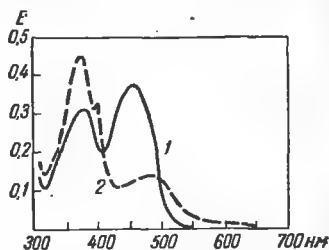
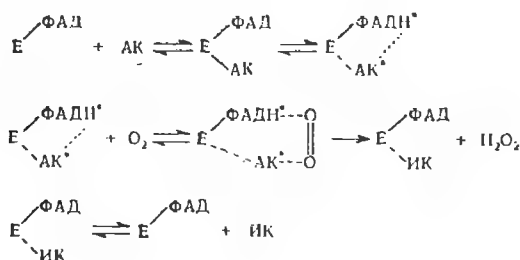


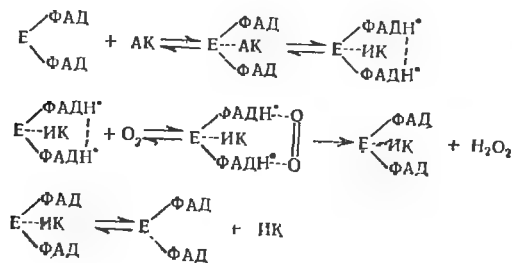
Рис. 62. Спектры поглощения оксидазы D -аминокислот.

1 — окисленная форма; 2 — искусственный семихинон [37].

радикала, а в полувосстановительной форме, полученной при помощи субстрата, такой сигнал отсутствует [37]. В связи с этим возникает предположение, что промежуточные продукты оксидаз аминокислот значительно отличаются от промежуточных продуктов других флавопротеинов. С другой стороны, тот факт, что спектральные свойства активного промежуточного флавопротеида все же близки к другим флавопротеидам, и тот факт, что при полном восстановлении фермент становится менее активным, позволяют думать, что различия не очень велики. Отсутствие свободных радикалов при действии оксидаз аминокислот попытались объяснить следующим образом. Massey, Gibson [49] предложили схему для оксидазы *D*-аминокислот, согласно которой образование флавинового семихинона сопровождается возникновением свободного радикала на присоединенной к ферменту аминокислоте. Два свободных радикала взаимодействуют друг с другом и этим обуславливается исчезновение сигнала в спектрах ЭПР. Ниже приводится предполагаемая последовательность реакций при действии оксидазы *D*-аминокислот по Massey [49]. Этот механизм предполагает образование тройного фермент-субстратного комплекса, что доказано кинетически. Однако конкретные доказательства образования написанных промежуточных продуктов отсутствуют. Поэтому существует и другой возможный механизм, предложенный Wellner [4]. Автор, исходя из того, что в молекуле фермента имеются 2 молекулы флавина, предполагает, что они обе участвуют в образовании активного центра. В этом случае два водорода из аминокислоты присоединяются сразу к 2 флавинам, находящимся в одном активном центре. Образовавшиеся 2 свободных радикала взаимодействуют между собой, в результате чего исчезает сигнал в спектрах ЭПР. Схема Wellner приводится ниже.



Как видно из приводимой схемы, кинетический механизм идентичен с ранее разобранным. Конкретные данные о правильности одной из схем пока отсутствуют, если не считать того странного факта, что свободный радикал обнаруживается при искусственном восстановлении. Если оба флавина взаимодействуют, его не должно было бы быть.



Таким образом, из приводимого материала следует, что семихинонная форма флавина является весьма важной в каталитических превращениях флавинов. Она встречается среди промежуточных продуктов многих ферментативных процессов. Однако она, по всей вероятности, не единственная, возможны и другие формы флавина. Они также различаются в разных ферментах, так как свойства флавинов сильно зависят от структуры белка и наличия ионов металлов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Flavins and Flavoproteins. Ed. E.C.C. Slater. Elsevier Publishing Company. Amsterdam, 1966.
2. Hemmerich P., Veeger C. Wood H. *Angew. Chem.*, 1965, 77, 699.
3. Strittmatter P. *Ann. Rev. Biochem.*, 1966, 35, 125.
4. Wellner D. *Ann. Rev. Biochem.*, 1967, 36, 669.
5. Miller R., Massey V. J. *Biol. Chem.*, 1965, 240, 1453.
6. De Kok A., Veeger C. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 167, 35.
7. Lusty C. J. *Biol. Chem.*, 1963, 238, 3443.
8. Wren A., Massey V. *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 110, 329.
9. Woodin T., Segel I. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 164, 64.
10. Massey V., Williams C. J. *Biol. Chem.*, 1965, 240, 4470.
11. Zannetti G., Williams C. J. *Biol. Chem.*, 1967, 242, 5232.
12. Brumby P., Miller R., Massey V. J. *Biol. Chem.*, 1965, 240, 2222.
13. Rajagopalan K., Fridovich J., Handler P. J. *Biol. Chem.*, 1962, 237, 922.
14. Singer T., Kearney E., Bernath P. J. *Biol. Chem.*, 1956, 223, 599.
15. Ervin V., Hellerman L. J. *Biol. Chem.*, 1967, 242, 4230.

16. Kumagai H., Matsui H., Ogata K., Yamada H. *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 171, 1.
17. Swoboda B. *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 175, 365.
18. Warburg O., Christian W. *Biochem. Z.*, 1938, 298, 150.
19. Wang Tsin Yang, Chon Chen Lin, Wang Ying Lai. *Sci. Sinica Peking*, 1958, 7, 65.
20. Richert D., Westerfield W. J. *Biol. Chem.*, 1954, 209, 179.
21. Green D., Mii S., Kohout P. J. *Biol. Chem.*, 1955, 217, 551.
22. Nanasi P., Cerletti P., Magni G., Nemes-Nanasi E. *FEBS Abstracts*. Madrid, 1969, 73.
23. Singer T., Salach J., Hemmerich P., Ehrenberg A. *FEBS Abstracts*. Madrid, 1969, 51.
24. Strittmatter P. J. *Biol. Chem.*, 1961, 236, 2329.
25. Massey V., Curti B. J. *Biol. Chem.*, 1966, 241, 3417.
26. Kalse J., Veeger C. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 159, 244.
27. Wisser J., Veeger C. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 159, 265.
28. Swoboda B. *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 175, 380.
29. Chassy B., McCormick D. *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 110, 95.
30. Wisser J., McCormick D., Veeger C. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 159, 257.
31. Alberty R. J. *Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 1928.
32. Massey V., Curti B. J. *Biol. Chem.*, 1967, 242, 1259.
33. Koster J., Veeger C. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 151, 11.
34. Dervatanian D., Zeylemaker W., Veeger C. В кн.: *Flavins and Flavoproteins*. Ed. E. C. Slater. Amsterdam, 1966, 183.
35. Massey V., Gibson Q., Veeger C. *Biochim. J.*, 1960, 77, 341.
36. Massey V., Veeger C. *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 40, 184.
37. Massey V., Palmer G. *Biochemistry*, 1966, 5, 3181.
38. Palmer G., Massey V. *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 58, 349.
39. Misaka E. J. *Biochem.*, 1966, 60, 496.
40. Глемжа А. А., Глемжени И. И. *Биохимия*, 1969, 34.
41. Searls R., Sanadi D. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 1960, 3, 189.
42. Massey V., Palmer G., Williams C., Swoboda B., Sands R. В кн.: *Flavins and Flavoproteins*, Ed. E. C. Slater. Amsterdam, 1966, 256.
43. Zannetti G., Williams C., Massey V. J. *Biol. Chem.*, 1968, 243, 4013.
44. Zeylemaker W., Dervatanian D., Veeger C. *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 99, 183.
45. Rajagopalan K., Handler P., Palmer G., Beinert H. J. *Biol. Chem.*, 1968, 243, 3784.
46. Beinert H., Sands R. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 1960, 3, 41.
47. Dervatanian D., Veeger C., van Voorst J. *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 73, 660.
48. Hemmerich P., Dervatanian D., Veeger C., van Voorst J. *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 77, 504.
49. Massey V., Gibson Q. *Fed. Proc.*, 1964, 23, 18.

КОФЕРМЕНТЫ ПЕРЕНОСА ГРУПП

ХИМИЯ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ,
СВЯЗАННЫХ С НУКЛЕОЗИДДИФОСФАТСАХАРАМИ

В. Н. ШИБАЕВ

*Институт органической химии имени Н. Д. Зелинского
АН СССР, Москва*

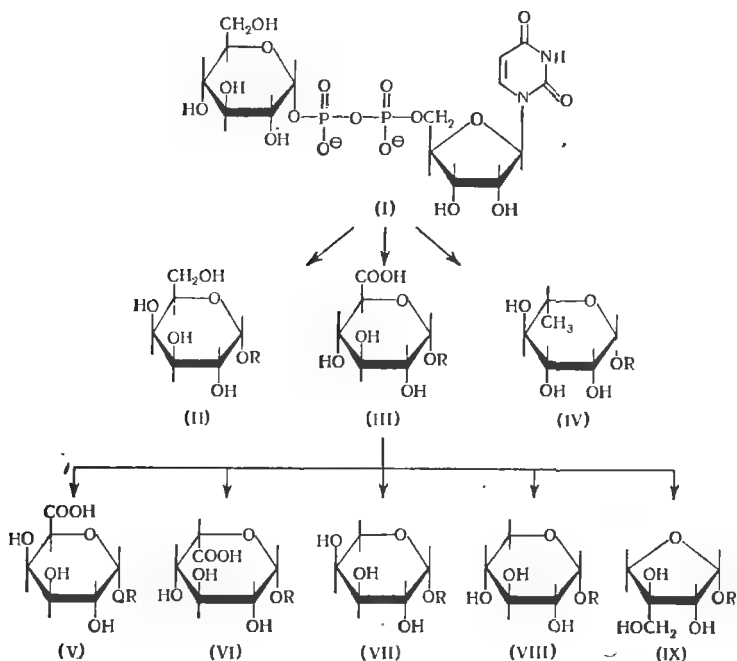
Нуклеозиддифосфатсахара (НДФС)¹ — обширная группа природных несимметричных пирофосфатов, аналогичная по своему строению таким известным коферментам, как пиридиновые или флавиновые нуклеотиды. Однако, строго говоря, эти соединения нельзя относить к группе коферментов. До сих пор они никогда не были обнаружены в виде прочно связанных с белком простетических групп. Их биохимические реакции отличаются большим разнообразием и могут быть связаны либо с превращениями остатка моносахарида, входящего в их состав, либо с переносом гликозильного остатка на подходящие акцепторы с образованием нуклеозид-5'-дифосфатов (НДФ) и соответствующих гликозидов, олигосахаридов, полисахаридов или смешанных биополимеров, содержащих углеводные остатки. Нуклеозид-5'-дифосфат может быть через ряд ферментативных реакций вновь превращен в нуклеозиддифосфатсахар и, таким образом, может в этой ферментативной системе функционировать как кофермент. Известны также реакции нуклеозиддифосфатсахаров, при которых происходит перенос остатка гликозилфосфата и образование нуклеозид-5'-фосфата.

В настоящее время из природных объектов выделено свыше 50 различных НДФС, отличающихся структурой остатка нуклеозида и остатка сахара (см. последние обзоры по выделению из природных источников и биохимическим

¹ В статье использованы следующие сокращения: УДФ — уридин-5'-дифосфат; АДФ — аденозин-5'-дифосфат; ГДФ — гуанозин-5'-дифосфат; ЦДФ — цитидин-5'-дифосфат; ТДФ — тимидин-5'-дифосфат; НАД — никотинамидадениндинуклеотид; НАДФ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат; УДФГ — уридиндифосфатглюкоза.

реакциям НДФС [1, 2]. Для клеток высших животных характерно присутствие НДФС — производных уридина и гуанозина, в высших растениях часто встречаются также аденозиндифосфатсахара. Наконец, в микроорганизмах, помимо НДФС — производных уридина и гуанозина, — широко распространены также тимидин- и цитидиндифосфатсахара, участвующие в биосинтезе специфических для этих организмов дезокси- и аминоксезоксисахаров. Описаны также единичные случаи выделения ферментативных систем, способных катализировать синтез инозиндифосфатсахаров.

Превращения НДФС, приводящие к изменению структуры остатка моносахарида, играют важную роль при переходе от моносахаридов, являющихся первичными продуктами фотосинтеза или получаемых организмами с пищей, к специфическим моносахаридам, встречающимся в различных углеводсодержащих биополимерах данного организма. Разнообразие наблюдаемых при этом ферментативных реакций может быть проиллюстрировано на примере уридиндифосфатсахаров.



Под действием УДФ-глюкозо-4-эпимеразы — фермента, широко распространенного в животных, растениях и микроорганизмах, — происходит обратимая эпимеризация у С-4 моносахаридного остатка УДФ-глюкозы (I), приводящая к УДФ-галактозе (II). Из экстрактов хлореллы и некоторых высших растений получен фермент, катализирующий сложную реакцию превращения УДФ-глюкозы в УДФ-*L*-рамнозу (IV), состоящую в восстановлении CH_2OH -группы гексозы и эпимеризации у С-3, С-4 и С-5 [3]. Широко распространен фермент УДФ-глюкозо-дегидрогеназа, катализирующая 2-электронное окисление по С-6 — переход от УДФ-глюкозы к УДФ-глюкуроновой кислоте (III). Последняя может также претерпевать целый ряд разнообразных реакций: декарбоксилирование с образованием УДФ-*D*-ксилозы (VIII) и декарбоксилирование, сопровождающееся эпимеризацией у С-4 [образование УДФ-*L*-арабинозы (VII)] или перегруппировкой углеродного скелета [4] [образование УДФ-*D*-апиозы (IX)], эпимеризацию у С-4 [синтез УДФ-галактуроновой кислоты (V)] или С-5 [синтез УДФ-*L*-идуруновой кислоты (VI)]. Подобные превращения известны и для НДФ-сахаров других классов (например, ГДФ-*D*-манноза может переходить в ГДФ-*D*-маннуруновую кислоту, ГДФ-*L*-фруктозу, ГДФ-*D*-рамнозу, ТДФ-*D*-глюкоза — в ГДФ-*L*-рамнозу, ТДФ-4-амино-4,6-дидезоксигексозы и ЦДФ-глюкоза — в ЦДФ-3,6-дидезоксигексозы). В этих реакциях, по-видимому, довольно универсальными промежуточными продуктами являются НДФ-4-кето- и НДФ-4-кето-6-дезоксисахара.

Гликозилирование с участием НДФС приводит к получению различных углеводсодержащих биополимеров; с помощью этой реакции происходит образование практически всех встречающихся в природе типов гликозидной связи. Гликозилированию может подвергаться спиртовой гидроксил, фенольный гидроксил, гликозидный гидроксил, карбоксильная группа, аминогруппа и меркаптогруппа. При синтезе полисахаридов может происходить образование всевозможных изомеров, отличающихся по конфигурации гликозидной связи и положению гликозилируемого гидроксила, как это показано для случая глюканов в табл. 12. Интересно подчеркнуть, что в этом случае часто наблюдается двойственная специфичность ферментов по отношению к природе остатка нуклеозида в НДФС: так, при синтезе крахмала и гликогена могут быть использованы УДФ-глюкоза и АДФ-глюкоза, хотя в каждом случае один из доно-

Ферментативный синтез глюкоанов из нуклеозиддифосфатсахаров [5]

Глюкан	Тип связи	Источник фермента	Остаток нуклеозида в НДФ-глюкозе
Гликоген	α -1,4	Дрожжи,	Уридин
»	α -1,4	Животные	Аденозин
Крахмал	α -1,4	Бактерии	»
Целлюлоза	β -1,4	Растения	Гуанозин или уридин
Каллоза	β -1,3	»	Уридин
Парамилон	β -1,3	Жгутиковые	»
β -1,2-глюкан	β -1,2	<i>Rhizobium japonicum</i>	»

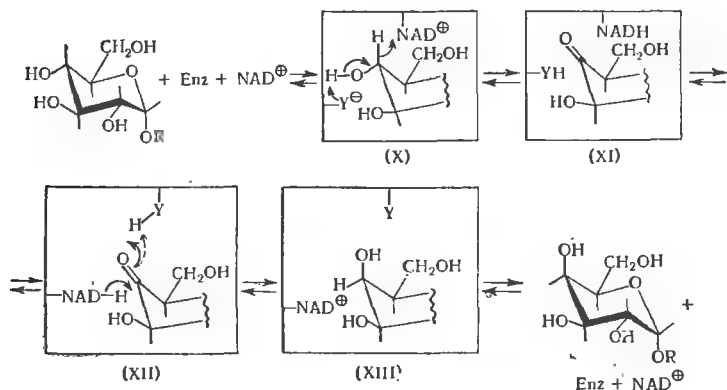
ров гликозильного остатка намного эффективнее в присутствии соответствующего фермента. Аналогичная картина наблюдается при синтезе целлюлозы: известны ферменты, которые способны осуществлять эту реакцию только на основе гуанозиндифосфатглюкозы или уридиндифосфатглюкозы и ферменты, которые могут использовать оба эти НДФ-сахара.

Сведения о механизме ферментативных реакций с участием НДФС крайне ограничены. В большинстве случаев элементарные стадии процессов остаются невыясненными, а о природе функциональных групп ферментов, участвующих в реакции, неизвестно практически ничего. Ниже излагаются данные о механизме ферментативных реакций синтеза УДФ-глюкуроновой кислоты и УДФ-галактозы из УДФ-глюкозы, а также ТДФ-*L*-рамнозы из ТДФ-глюкозы.

Реакция, катализируемая УДФ-глюкозо-дегидрогеназой, — окисление по С-6 остатка глюкозы в УДФ-глюкозе — под действием НАД с переносом двух гидрид-ионов необычна и почти не имеет аналогий в ферментативных реакциях окисления-восстановления. Последние связаны обычно с переносом одного гидрид-иона, т. е. с окислением спирта до альдегида или альдегида до кислоты. Естественно ожидать, что рассматриваемая реакция носит двустадийный характер и промежуточным в ней является продукт, образующийся при удалении одного гидрид-иона от молекулы УДФ-глюкозы. В 1966 г. Simonart и др. сообщили о выделении промежуточного продукта, образующегося после восстановления 1 экв. НАД под действием УДФ-глюкозы; в состав этого продукта входит неизменный остаток глюкозы

и модифицированный остаток уридина [6]. В новых работах [7, 8], однако, не удалось получить доказательств образования какого-либо промежуточного продукта в реакции, катализируемой УДФ-глюкозо-дегидрогеназой. Неудачей кончились и предпринятые еще раньше попытки обнаружить альдегид, лактон, амид или ацилмеркаптан в качестве промежуточного продукта реакции [9]. Недавно удалось показать промежуточные образования производного гексодиаальдозы в этой реакции [42].

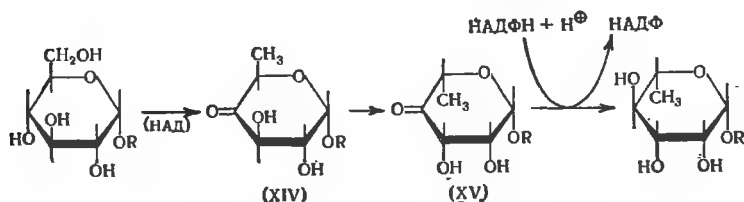
Несколько лучше изучена реакция, катализируемая УДФ-глюкозо-4-эпимеразой. Вся совокупность накопленных данных согласуется со следующим механизмом процесса:



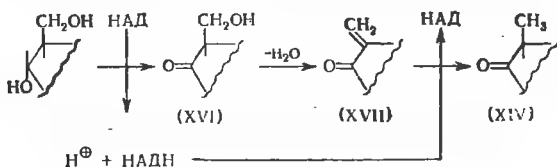
Для осуществления реакции необходимо присутствие НАД; в некоторых случаях, как, например, для УДФ-глюкозо-4-эпимераз дрожжей [10] и высших растений [11], этот кофермент достаточно прочно связан с апоферментом. Внутри фермент-субстратного комплекса (X) происходит перенос гидрид-иона с образованием восстановленной формы НАД; последнее доказано на основании изменения спектров флюоресценции фермента в ходе реакции [12]. Одновременно происходит, по-видимому, атака нуклеофильной группы фермента на водород гидроксильной группы или углеродный атом С-4 с образованием связанного с ферментом УДФ-4-кетосахара, как это изображено на формуле XI, или его производного. Следующей стадией процесса является перегруппировка фермент-субстратного комплекса, в итоге которой изменяется относительное положение НДФ-сахара и восстановленного пиридинового нуклеотида.

Исследование изотопного эффекта реакции показывает, что эта перегруппировка является наиболее медленной стадией процесса [13]. В образовавшемся фермент-субстратном комплексе XII происходит восстановление УДФ-4-кетосахара, причем в остаток сахара включается тот же атом водорода, который был отщеплен при переходе X—XI [14]. Получающийся комплекс XIII диссоциирует далее с образованием УДФ-галактозы: Пиримидиновые нуклеотиды в составе комплексов X—XIII не могут обменивать водород с окружающей средой, так что включения метки в продукт реакции из добавленного НАДН не происходит. Прочно связан с ферментом и промежуточно образующийся НДФ-4-кетосахар или его производное; его не удалось выделить или превратить в какой-либо продукт, пригодный для идентификации.

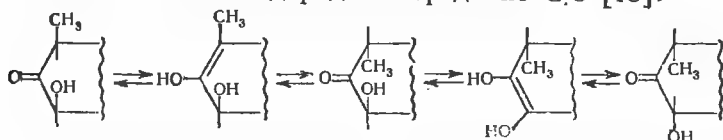
Превращение ТДФ-глюкозы в ТДФ-*L*-рамнозу происходит в результате последовательного действия 3 ферментов. Для реакции требуются каталитические количества НАД и эквивалентное количество восстановленной формы НАДФ.



На 1-й стадии процесса происходит превращение ТДФ-глюкозы в ТДФ-4-кето-6-дезоксиглюкозу (XIV). Механизм этого процесса состоит, по современным данным, в окислении исходного НДФ-сахара до ТДФ-4-кетоглюкозы (XIV) — процесса, аналогичного рассмотренному выше при эпимеризации УДФ-глюкозы. Образующееся производное кетосахара легко дегидратируется с образованием производного 5,6-глюкозеена (XVII) — α , β -непредельного кетона, который восстанавливается до ТДФ-4-кето-6-дезоксиглюкозы.



Этот механизм согласуется с результатами изотопных исследований: при превращении ТДФ-глюкозы в ТДФ-4-кето-6-дезоксиглюкозу происходят переход атома водорода от С-4 к С-6 [15, 16], потеря атома водорода от С-5 [17] и включение атома водорода из среды по С-5 [15].



На второй стадии процесса ТДФ-4-кето-6-дезоксиглюкоза претерпевает эпимеризацию у С-3 и С-5. Эта реакция включает, очевидно, кето-энольные переходы, как это изображено на схеме.

Такой механизм согласуется с включением протона из среды по С-3 и С-5 ТДФ-*L*-рамнозы [18]. Продукт эпимеризации — ТДФ-4-кето-6-дезоксид-*L*-манноза (XV), — оставаясь связанным с ферментом, подвергается стереоспецифическому восстановлению по С-4 под действием восстановленной формы НАДФ, переходя, таким образом, в конечный продукт реакции — ТДФ-*L*-рамнозу.

Рассмотренные примеры показывают, что превращения НДФ-сахаров, приводящие к изменению структуры углеводного остатка, являются сложными многостадийными реакциями, важные детали которых остаются непонятными. Еще менее изучен механизм реакций гликозилирования под действием НДФС. В этой группе реакций остается пока невыясненным кардинальный вопрос механизма, происходит ли гликозилирование в результате непосредственной нуклеофильной атаки акцептора гликозильного остатка на С-1 остатка сахара в НДФС или предварительно происходит перенос остатка сахара на функциональную группу фермента и образовавшийся гликозилфермент служит далее донором остатка сахара.

Одной из важных сторон исследования, необходимых для полного понимания механизма ферментативных реакций НДФС, является выяснение того, какие функциональные группы субстрата необходимы для связывания его с ферментом и для самой ферментативной реакции. Особенно интересно в случае рассматриваемых соединений выяснение значения функциональных групп гетероциклического ядра, которое на первый взгляд не участвует в ферментативных реакциях, приводящих к превращениям сахарного остатка. Между тем гликозилфосфаты не способны вступать в реак-

ции, характерные для НДФ-сахаров. Можно предложить *a priori* 3 возможных механизма для объяснения этого факта. Во-первых, можно считать, что остаток нуклеозида НДФ-сахара вносит большой вклад в связывание субстрата с ферментом, взаимодействуя с соответствующей «якорной площадкой» фермента, вследствие чего гексозилфосфат связывается с ферментом настолько слабо, что его превращение не может быть обнаружено.

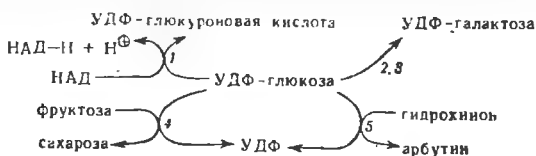
Еще более вероятным кажется предположение, что при связывании остатка нуклеозида субстрата с некоторым участком фермента происходит конформационная перестройка последнего, в результате чего формируется конформация активного центра, необходимая для ферментативной реакции. Наконец, возможно, что необходимой предпосылкой для образования фермент-субстратного комплекса является такая конформация НДФС, при которой гетероциклическое ядро нуклеозида и остаток сахара сближены, и гетероциклическое ядро непосредственно участвует в ферментативной реакции. Такое участие может быть связано со способностью оснований нуклеиновых кислот выступать в качестве доноров или акцепторов протона или востанавливаться (служить акцепторами гидрид-иона). Функциональные группы нуклеиновых оснований могут образовывать водородные связи с гидроксильными группами остатка сахара, что приводит к стабилизации определенных конформаций последнего и к созданию благоприятных стереохимических условий для определенных химических процессов.

Последняя возможность была рассмотрена нами ранее более детально [19]. Было показано, что закономерности структуры природных НДФС и стереохимия их биохимических реакций, приводящих к изменению структуры остатка моносахарида, могут быть хорошо объяснены, исходя из предположения о взаимодействии гетероциклического ядра и углеводного остатка НДФС в фермент-субстратных комплексах. Поскольку данные по кинетике некоторых химических реакций УДФ-глюкозы и ее аналогов позволяют сделать вывод о существовании такого рода взаимодействий в водных растворах НДФС [20, 21], эта концепция была использована нами в качестве рабочей гипотезы при получении и биохимическом изучении синтетических аналогов УДФ-глюкозы.

Начиная эту работу, мы надеялись с помощью биохимического исследования синтетических аналогов УДФ-глюко-

зы получить информацию о том, какие функциональные группы необходимы для того, чтобы эти соединения могли служить субстратами или ингибиторами ферментативных реакций. Было интересно сопоставить требования к структуре субстрата, предъявляемые различными ферментами обмена УДФ-глюкозы, и выяснить черты сходства и различия между этими ферментами. Наконец, казалось весьма интересным попытаться использовать полученные данные для ответа на вопрос, каково значение гетероциклического ядра НДФ-сахара для их биохимических реакций, в частности проверить, согласуются ли структурные требования ферментов к субстрату с гипотезой об участии гетероциклического ядра НДФС в ферментативной реакции за счет образования водородных связей с гидроксильными группами углеводного остатка.

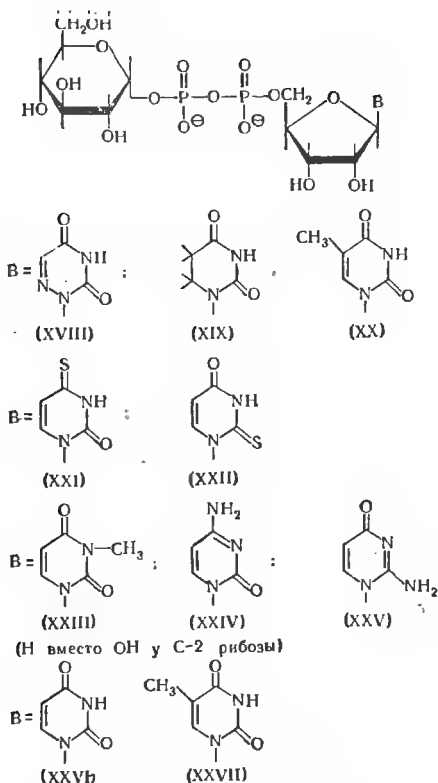
Для биохимического исследования было выбрано пять различных ферментов, специфичных к УДФ-глюкозе, которые катализируют реакции, представленные на схеме:



В число выбранных входят 3 фермента, катализирующих изменение углеводного остатка сахара — УДФ-глюкозо-дегидрогеназа из печени телят (1) [22] и две УДФ-глюкозо-4-эпимеразы, различающиеся по своим свойствам, — фермент из печени телят (2) [23] и из проростков маша (*Phaeosolus aureus*) (3) [11]. Далее было исследовано два фермента гликозилирования — УДФ-глюкоза: фруктоза-глюкозилтрансфераза из проростков гороха (4), катализирующая гликозилирование фруктозы с образованием α-глюкозидной связи [24], и УДФ-глюкоза: дифенол-β-глюкозилтрансфераза из зародышей пшеницы (5), катализирующая гликозилирование гидрохинона с образованием β-глюкозида [25].

Первым этапом работы было исследование синтетических аналогов УДФ-глюкозы с измененным остатком нуклеозида (см. формулу на стр. 186).

Было показано, что степень специфичности различных ферментов обмена УДФГ по отношению к структуре остатка нуклеозида довольно близка [11, 24, 26—31]. Именно субстратами всех изученных ферментов могут служить ана-

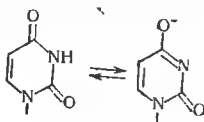


логи группы «а», в которых гетероциклическое ядро урацила модифицировано у С-5 или С-6, т. е. 6-аза-УДФГ (XVIII), 5,6-дигидро-УДФГ (XIX) и 5-метил-УДФГ (XX), а также аналоги группы «б» — 4-тио-УДФГ (XXI) и 2-тио-УДФГ (XXII), в которых изменение гетероциклического ядра сводится к замене карбонильной группы на тиокарбонильную. С другой стороны, более радикальное изменение ациламидной группировки—CONHCO—гетероциклического ядра, как в аналогах группы «в» — 3-метил-УДФГ (XXIII), цитидиндифосфатглюкозе (XXIV) и изоцитидиндифосфатглюкозе (XXV), приводит к потере субстратных свойств. Таким образом, упомянутая группировка является, по-видимому, необходимой для того, чтобы аналог УДФГ мог служить субстратом в различных ферментативных реакциях. Этот вывод подтверждается некоторыми данными, полученными в других лабораториях по исследованию биохимического

поведения аналогов УДФГ, которые по нашей классификации попадают в группу «а». Так было показано, что 5-фтор-УДФГ [32], 5-окси-УДФГ [7] и псевдоуридиндифосфат-глюкоза [33] могут служить субстратами УДФГ-дегидрогеназы.

При исследовании аналогов с измененным остатком рибозы (группа «г») было найдено, что 2'-дезоксидеозид (XXVI) может служить субстратом для всех пяти исследованных ферментов, хотя величина K_m сильно повышается по сравнению с УДФГ. При переходе к тимидиндифосфат-глюкозе (XXVII) происходит дальнейшее ухудшение субстратных свойств: это соединение уже не может служить субстратом для УДФГ:фруктоза-глюкозилтрансферазы и крайне медленно реагирует с УДФГ-дегидрогеназой. Эти результаты показывают, что хотя гидроксильная группа у С-2 рибозы не является абсолютно необходимой для способности аналога участвовать в ферментативных реакциях, ее отсутствие при одновременной модификации гетероциклического ядра может приводить к потере биологической активности аналога.

Уридин и его производные являются слабыми кислотами, ионизирующимися в слабощелочной среде.



В связи с этим встает вопрос о том, какая форма гетероциклического ядра является необходимой для образования фермент-субстратного комплекса. Американские исследователи на основании анализа зависимости от рН скорости реакции УДФГ, 6-аза-УДФГ и 5-фтор-УДФГ с УДФГ-дегидрогеназой пришли к выводу о том, что в реакции участвует остаток нуклеозида в неионизированной форме [32]. Нам удалось показать, что аналогичные зависимости наблюдаются для двух УДФГ-4-эпимераз и УДФГ:фруктоза-глюкозилтрансферазы. По-видимому, требование неионизированной формы гетероциклического ядра является общим для различных ферментов обмена УДФГ.

При качественном сходстве субстратной специфичности различных ферментов по отношению к структуре остатка нуклеозида в аналогах УДФГ между ними наблюдаются заметные количественные различия, т. е. величины K_m и v

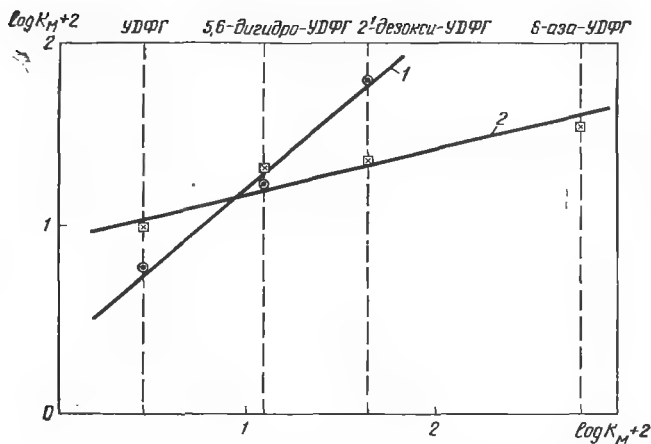


Рис. 63. Линейная корреляция между величинами констант Михаэлиса. По оси абсцисс отложены значения $\log K_M + 2$ для УДФГ-дегидрогеназы, по оси ординат — для УДФГ-4-эпимераз (K_M выражено в ммоль/л).

1 — УДФГ-4-эпимераза из печени телят; 2 — УДФГ-4-эпимераза из проростков маша.

при изменении структуры остатка нуклеозида меняются по-разному для различных ферментов. В этом изменении есть, однако, свои закономерности.

Как видно из рис. 63, между величинами констант Михаэлиса ряда аналогов УДФГ для УДФГ-дегидрогеназы и двух УДФГ-4-эпимераз наблюдается довольно хорошая линейная корреляция. Этот результат показывает, что в данном ряду аналогов изменение их сродства к ферменту связано, по-видимому, прежде всего с изменением электронных влияний заместителей на свойства функциональных групп, необходимых для образования фермент-субстратного комплекса. В связи с этим представляется интересным более детальный анализ корреляции между электронными свойствами заместителей в гетероциклическом ядре аналогов УДФГ и способностью этих соединений участвовать в ферментативных реакциях. Такой анализ входит в программу наших дальнейших исследований.

Существенно обратить внимание на тот факт, что модификация гетероциклического ядра может приводить не только к изменению величины K_M , но и к заметному изменению величины максимальной скорости реакции v . Наиболее ярким примером в этом отношении является поведе-

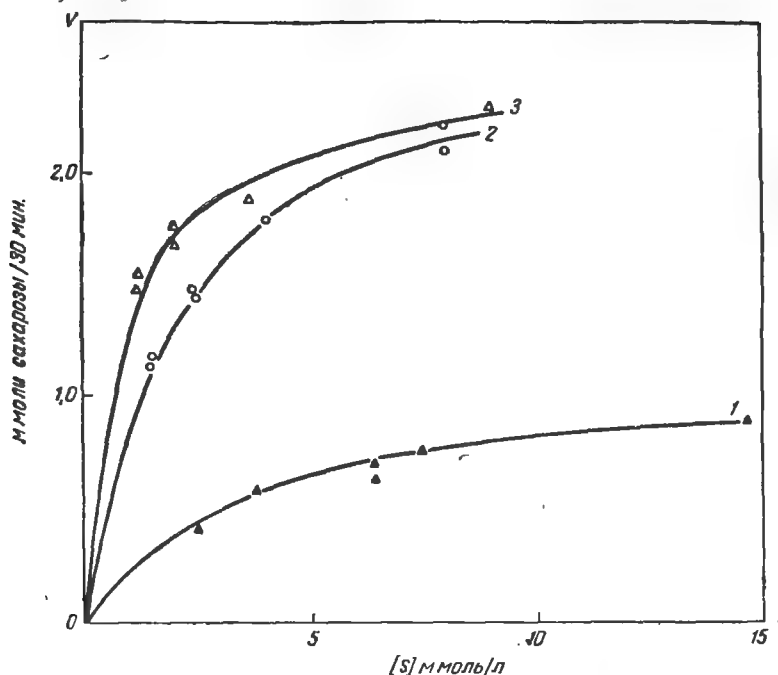


Рис. 64. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата при взаимодействии нуклеозиддифосфатсахаров с УДФГ.

D-фруктоза-глюкозилтрансферазой из проростков гороха; 1 — АДФГ (K_M 3,19, V 1,04); 2 — УДФГ (K_M 1,88, V 2,64); 3 — УДФГ в присутствии АДФГ 9 ммольей (K_M 0,82, V 2,30).

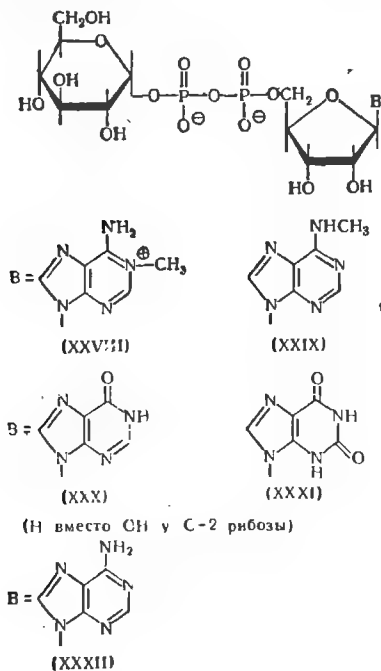
K_M выражено в ммоль/л, V — в ммольсах сахарозы, образующейся за 30 минут реакции.

ние 5-метил-УДФГ в реакции с УДФГ:фруктоза-глюкозилтрансферазой [31]. В этом случае K_M для УДФГ и 5-метил-УДФГ близки, и более медленная скорость реакции аналога обусловлена практически только изменением максимальной скорости. Изменение V наблюдалось и при взаимодействии аналогов УДФГ с другими ферментами.

Выше уже упоминалось, что для многих ферментов, катализирующих гликозилирование под действием НДФ-сахаров, характерна двойственная субстратная специфичность по отношению к природе остатка нуклеозида. Этим свойством обладает и один из изучаемых нами ферментов — УДФГ:фруктоза-глюкозилтрансфераза. В реакции, катализируемой этим ферментом, субстратом может слу-

жить не только УДФГ, но и АДФГ [54]. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата представлена на рис. 64; опыт по совместной инкубации 2 субстратов (кривая 3) ясно показывает, что оба субстрата взаимодействуют с одним и тем же ферментом.

С целью выяснения требований фермента к структуре остатка нуклеозида в АДФГ было осуществлено получение ряда синтетических аналогов этого НДФ-сахара. Взаимодействие некоторых из них с УДФГ:фруктоза-глюкозил-трансферазой уже изучено к настоящему времени [34]. Их структуры приведены ниже.

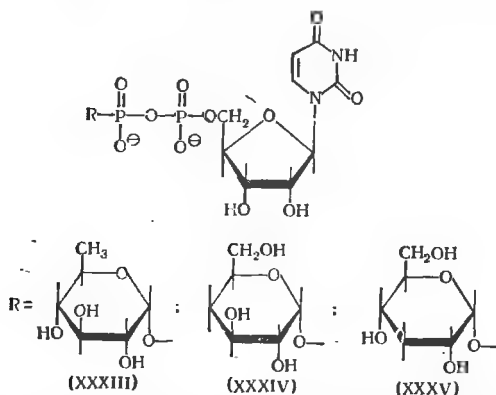


Полученные результаты показывают, что только 2'-дезоксиде-АДФГ (XXXII) обладает свойствами субстрата для изучаемого фермента. Модификация группировки $\text{—N}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{—}$ в пуриновом ядре с помощью введения метильных групп [аналоги группы «д» — 1-N-метил-АДФГ (XXVIII) и N⁶-метил-АДФГ (XXIX)] приводит к потере субстратных свойств; соединение XXVIII обладает, однако, способностью ингибировать ферментативную реакцию. Ана-

логи группы «е» — инозиндифосфат-глюкоза (XXX) и ксантин-дифосфат-глюкоза (XXXI) содержат в пуриновом ядре группировку $-\text{NHCO}-$, которая имеет важное значение для биологической активности УДФГ — другого субстрата этого же фермента. Эти аналоги не обладают ни свойствами субстратов, ни свойствами ингибиторов.

Эти данные позволяют сделать предварительный вывод о том, что группировка $-\text{N}=\text{C}(\text{NH}_2)-$ пуринового ядра, по-видимому, имеет существенное значение для биологической активности АДФГ. Дальнейшее исследование биохимического поведения синтетических аналогов АДФГ, проводимое в настоящее время, должно позволить более четко выяснить значение других структурных элементов пуринового ядра.

Далее мы применили подход, основанный на использовании синтетических аналогов, для изучения роли, которую играют гидроксильные группы остатка гексозы в УДФГ при образовании фермент-субстратных комплексов и осуществлении самой ферментативной реакции. С этой целью было исследовано поведение в ферментативных реакциях трех аналогов УДФ-глюкозы, содержащих остатки дезоксисахаров — УДФ-6-дезоксиглюкозы (XXXIII), УДФ-4-дезоксиглюкозы (XXXIV) и УДФ-3-дезоксиглюкозы (XXXV).



Полученные результаты показывают, что по специфичности к остатку гексозы изучаемые нами ферменты несколько различаются [35, 36]. Только соединение XXXV, лишенное гидроксильной группы у С-3, не могло служить субстратом для всех 5 изученных ферментов. Под действием УДФГ-дегидрогеназы не окисляется не только соедине-

ние XXXIII, лишенное спиртовой группы у С-6, но и УДФ-4-дезоксиглюкоза XXXIV. Эпимеризации УДФ-6-дезоксиглюкозы под действием УДФГ-4-эпимеразы из печени телят не удалось обнаружить, однако для одноименного фермента из маша это соединение является плохим субстратом. Специфичность гликозилирующих ферментов по отношению к XXXIII и XXXIV также различается: для УДФГ:фруктоза-глюкозилтрансферазы оба соединения являются малоэффективными субстратами, в то время как гликозирование, катализируемое УДФГ:дифенол-глюкозил-трансферазой, протекает в присутствии УДФ-6-дезоксиглюкозы весьма энергично, а УДФ-4-дезоксиглюкоза не обладает свойствами субстрата.

Свойства УДФ-дезоксигексоз как ингибиторов изучены в настоящее время подробно лишь на примере УДФГ-4-эпимераз [37]. Все эти соединения являются конкурентными ингибиторами ферментативной реакции. Их константы ингибирования сопоставлены в табл. 13 с константами Михаэлиса субстратов реакции.

Можно видеть, что удаление гидроксильной группы при С-4 приводит к ухудшению связывания соединения с ферментом в 2—4 раза по сравнению с УДФ-галактозой. Удаление же гидроксильных групп у С-3 или С-6 вызывает значительно более сильное ослабление сродства соединения к ферменту. С ферментом из проростков маша связывание по сравнению с УДФ-глюкозой уменьшается в 8—10 раз, а с ферментом из печени телят — приблизительно в 40 раз.

Таблица 13

Свойства субстратов и ингибиторов УДФГ-4-эпимераз

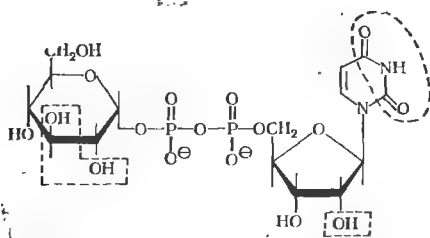
Соединение	Источник фермента	
	печень телят	проростки маша
1. Субстраты	K_m (ммоль/л)	
УДФ-глюкоза	0,06	0,10
УДФ-галактоза	0,12	0,20
2. Ингибиторы	K_i (ммоль/л)	
УДФ-6-дезоксиглюкоза	2,5	0,80
УДФ-4-дезоксиглюкоза	0,44	0,40
УДФ-3-дезоксиглюкоза	2,6	1,0

Эти результаты наглядно показывают важное значение гидроксильных групп у С-3 и С-6 остатка гексозы для связывания с ферментом.

Важность гидроксильных групп у С-6, С-4 и С-3 остатка гексозы для способности УДФ-гексоз служить субстратами УДФГ-4-эпимеразы из дрожжей была показана в работе Salo и др., в которой было изучено поведение ряда НДФС, содержащих остатки частично метилированных гексоз и D-аллозы — эпимера глюкозы по С-3 [38]. Эти же авторы обнаружили, что УДФ-манноза не может служить субстратом данного фермента и, следовательно, должная конфигурация гидроксильной группы у С-2 также имеет существенное значение. Было показано [39], с другой стороны, что УДФ-2-дезоксиглюкоза — хороший субстрат УДФГ: фруктоза-глюкозилтрансферазы и, следовательно, для данного фермента присутствие гидроксильной группы у С-2 гексозы не является обязательным.

Таким образом, исследование биохимического поведения синтетических аналогов НДФС позволило получить довольно обширную информацию о значении различных функциональных групп УДФ-глюкозы. Хотя полученная картина еще не является исчерпывающей, можно попытаться уже сейчас подвести некоторые итоги.

Упомянутая выше гипотеза об участии гетероциклического ядра в ферментативных реакциях НДФС за счет образования водородных связей с гидроксильными группами остатка сахара предсказывала, что структурными элементами УДФГ, обуславливающими его способность служить субстратом для различных ферментов, являются: (1) ациламидная группировка гетероциклического ядра —CONHCO— (2) гидроксильная группа у С-2 остатка рибозы и (3) гидроксильные группы у С-2 и С-3 остатка глюкозы [19].



Полученные результаты хорошо согласуются с этими предсказаниями. Именно введение в указанные участки мо-

лекулы групп, стерически препятствующих образованию водородных связей (например, N- или O-метилирование), или существенное изменение природы или стереохимии функциональных групп [например, обращение конфигурации у асимметрических центров в остатке сахара, замена группировки —NHCO— на $\text{—N=C(NH}_2\text{)—}$] приводит к потере субстратных свойств. Однако некоторые изменения на этих участках молекулы НДФС все же возможны. Так, карбонильные группы у C-2 и C-4 ядра урацила могут быть заменены на тиокарбонильные без потери биологической активности. Далее, гидроксильная группа у C-2 остатка рибозы может быть заменена на водород, хотя это и сопровождается резким уменьшением связывания аналога с ферментами. Аналогичная замена возможна, видимо, и для гидроксильной группы у C-2 остатка глюкозы; этот вопрос нуждается, однако, в дополнительном исследовании. Возможность указанных изменений не противоречит, однако, изложенной выше гипотезе. Согласно развитым представлениям, внутримолекулярные взаимодействия в НДФС осуществляются за счет образования 3 водородных связей, и отсутствие или ослабление одной из них может быть недостаточным для полного нарушения взаимодействия.

Имеющиеся экспериментальные данные показывают, что псевдоароматический характер ядра урацила не является существенным для субстратных свойств УДФГ. Возможно введение заместителей по C-5 или C-6 гетероциклического ядра; их влияние на субстратные свойства связано, по-видимому, с электронными эффектами.

По вопросу о значении гидроксильной группы у C-3 остатка рибозы и циклического кислорода рибозы экспериментальных данных пока не имеется.

Точно так же не ясно пока значение циклического кислорода остатка глюкозы. Гидроксильные же группы у C-4 и C-6, как оказалось, могут весьма существенно влиять на способность НДФС связываться с ферментом и на скорость протекания ферментативной реакции. Это влияние различно для разных ферментов и должно учитываться при обсуждении конкретных механизмов реакции.

Полученные результаты позволяют отвергнуть некоторые из обсуждавшихся ранее гипотез о роли гетероциклического ядра в ферментативных реакциях УДФ-глюкозы. Предположение о том, что остаток урацила УДФГ служит акцептором гидрид-иона при реакции, катализируемой УДФГ-4-эпимеразой, кажется несостоятельным, так как продукт восста-

новления УДФГ — производное 5,6-дигидроуридина — также может служить субстратом при этой реакции [40].

Маловероятным в свете современных данных кажется и предположение Калькара о том, что остаток урацила УДФГ функционирует как донор протона при УДФГ-4-эпимеразной реакции [41]. В самом деле, 6-аза-УДФГ (pK_a 6, 8) является приблизительно в 100 000 раз более сильной кислотой, чем 5,6-дигидро-УДФГ ($pK_a \sim 12$), в то время как максимальные скорости эпимеризации этих соединений близки между собой.

Выше уже отмечалось, что изменение гетероциклического ядра УДФГ может приводить к заметному изменению величины максимальной скорости ферментативной реакции. Этот факт позволяет отвергнуть гипотезу о том, что единственной функцией гетероциклического основания в НДФС является обеспечение достаточной энергии специфического связывания субстрата с ферментом.

Единственной серьезной альтернативой концепции об участии гетероциклического ядра НДФГ в ферментативной реакции посредством образования специфических водородных связей с остатком сахара и стабилизации его определенной конформации является следующий механизм ферментативной реакции: при связывании остатка нуклеозида НДФС с ферментом (например, путем образования водородных связей через группировку $-\text{CONHCO}-$ ядра и гидроксильную группу у С-2 рибозы) происходит изменение конформации последнего и формируется нужное для реакции пространственное расположение функциональных групп активного центра, которое стабилизируется взаимодействием с гидроксильными группами остатка сахара. С помощью такой гипотезы можно столь же удовлетворительно объяснить имеющиеся результаты. Данная гипотеза, к сожалению, не имеет заметной предсказательной силы, вследствие чего ее проверка крайне затруднительна. Возможно, что пути такой проверки станут более ясными после накопления данных о структуре и конформации ферментов, катализирующих реакции нуклеозиддифосфатсахаров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kelleher W. J. Pharm. Sci., 1965, 54, 1081.
2. Hassid W. В кн.: Metabolic Pathways (ed. by Greenberg D. M.) V.I, Academic Press. New-York — London, 1967, 307.
3. Barber G., Chang M. Arch. Biochem. Biophys., 1967, 118, 659.
4. Grisebach H. Helv. Chim. Acta, 1968, 51, 928.

5. *Manners D.* Ann. Rep. Progr. Chem., 1967, **63**, 590.
6. *Simonart P., Salo W., Kirkwood S.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 1966, **24**, 120.
7. *Roy-Burman P., Roy-Burman S., Visser D. J.* Biol. Chem., 1968, **243**, 1692.
8. *Zalitis J., Feingold D.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 1968, **31**, 693.
9. *Maxwell E., Kalckar H., Strominger J.* Arch. Biochem. Biophys., 1956, **65**, 2.
10. *Maxwell E., de Robinchon-Szulmajster H. J.* Biol. Chem., 1966, **235**, 308.
11. *Дружинина Т. Н., Новикова М. А., Шибает В. Н.* Биохимия, 1969, **34**, 108.
12. *Wilson D., Hogness D. J.* Biol. Chem., 1964, **239**, 2469.
13. *Bevill R., Hill E., Smith F., Kirkwood S.* Can. J. Chem., 1965, **43**, 1577.
14. *Bevill R., Smith F., Kirkwood S.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 1963, **12**, 152.
15. *Melo A., Elliot W., Glaser L. J.* Biol. Chem., 1968, **243**, 1467.
16. *Gabriel O., Lindquist L. J.* Biol. Chem., 1968, **243**, 1479.
17. *Hermann K., Lehman J.* Europ. J. Biochem., 1968, **3**, 369.
18. *Melo A., Glaser L. J.* Biol. Chem., 1968, **243**, 1475.
19. *Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибает В. Н.* Биохимия, 1963, **28**, 741.
20. *Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибает В. Н., Елисеева Г. И.* ДАН СССР, 1964, **159**, 605.
21. *Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибает В. Н., Елисеева Г. И.* Докл. АН СССР, 1967, **172**, 603.
22. *Strominger J., Maxwell E., Axelrod J., Kalckar H. J.* Biol. Chem., 1957, **224**, 79.
23. *Maxwell E. J.* Biol. Chem., 1957, **229**, 139.
24. *Габриэлян Н. Д., Козлова Н. Б.* Биохимия, 1966, **31**, 760.
25. *Yamata T., Cardini C.* Arch. Biochem. Biophys., 1960, **86**, 127.
26. *Габриэлян Н. Д., Новикова М. А., Жданов Г. Л.* ДАН СССР, 1963, **151**, 1453.
27. *Габриэлян Т. Н., Венкина А. В.* ДАН СССР, 1964, **156**, 1379.
28. *Дружинина Т. Н., Новикова М. А., Жданов Г. Л.* ДАН СССР, 1965, **164**, 1176.
29. *Габриэлян Н. Д., Венкина А. В.* ДАН СССР, 1965, **165**, 439.
30. *Budowsky E. I., Druzhinina T. N., Eliseeva G. I., Gabrieljan N. D., Novikova M. A., Shibaev V. N., Zhdanov G. L.* Biochim. Biophys. Acta, 1966, **122**, 213.
31. *Габриэлян Н. Д., Дружинина Т. Н., Елисеева Г. И., Лапина Е. Б., Лебедева К. С., Шибает В. Н.* Биохимия, 1969, **34**, 235.
32. *Rabinowitz M., Goldberg I. J.* Biol. Chem., 1963, **238**, 1801.
33. *Goldberg N., Dahl J., Parks R. J.* Biol. Chem., 1963, **238**, 3109.
34. *Gabrieljan N. D., Lapina E. B., Spiridonova S. M., Shibaev V. N., Kochetkov N. K., Budowsky E. I.* Biochim. Biophys. Acta, 1969, **185**, 470.
35. *Kochetkov N. K., Budowsky E. I., Gabrieljan N. D., Kusov Yu. Yu., Shibaev V. N.* Carbohydrate Res., 1967, **5**, 367.
36. *Kochetkov N. K., Budowsky E. I., Druzhinina T. N., Gabrieljan N. D., Komlev I. V., Kusov Yu. Yu., Shibaev V. N.* Carbohydrate Res., 1969, **10**, 152.
37. *Дружинина Т. Н., Новикова М. А., Шибает В. Н.* Биохимия, 1969, **34**, 518.

38. Salo W., Nordin J., Peterson D., Bevill R., Kirkwood S. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, **151**, 484.
39. Farkas V., Biely P., Bauer S. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, **165**, 63.
40. de Robichon-Szulmajster H. *J. Mol. Biol.*, 1961, **3**, 253.
41. Kalckar H. *Adv. in Enzymol.*, 1958, **20**, 111.
42. Nelsestuen G., Kirkwood S., *J. Biol. Chem.*, 1971, **246**, 3828.

ПИРИДОКСАЛЬ- И ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТ-ЗАВИСИМЫЕ ФЕРМЕНТЫ

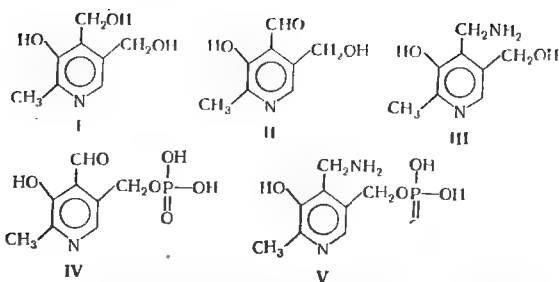
Е. С. СЕВЕРИН

Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва

В последние годы был достигнут значительный прогресс в изучении биологических функций витамина В₆ на молекулярном уровне. После открытия реакции ферментативного переаминирования (А. Е. Браунштейн, М. Г. Крицман, 1937 [1]) фронт исследования в этой области непрерывно расширялся, привлекая ученых различных специальностей — биохимиков, фармакологов, химиков-органиков и физико-химиков — из разных стран. Коферментные функции пиридоксальфосфата (витамина В₆) были расшифрованы после химического обоснования принципиальной схемы реакций, катализируемых пиридоксальевыми ферментами [2], и изучения механизма модельных реакций пиридоксаля и пиридоксальфосфата [3, 4]. Наконец, доступность большого числа пиридоксальевых ферментов в высокоочищенном и индивидуальном состоянии позволило на примере В₆-зависимых ферментов исследовать общие функциональные закономерности ферментативного катализа.

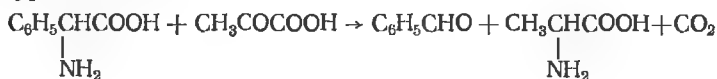
В 1934 г. Gyorgy в дрожжах обнаружил вещество витаминной природы, названное им витамином В₆ [15]. Интенсивное изучение природы витамина В₆ привело к установлению его структурной формулы, соответствующей 2-метил-3-окси-4, 5-диоксиметилпиридину — пиридоксину (1) [6].

При изучении свойств пиридоксина было установлено, что его биологическая активность значительно возрастает при окислении и аминировании. Позднее были выделены, а затем и синтезированы основные производные пиридоксина — пиридоксаль (II) и пиридоксамин (III) [7]. Вскоре после этого из ряда природных источников (ферментных препаратов) удалось выделить фосфатные производные витамина В₆ — пиридоксаль-5'-фосфат (IV) [8] и пиридоксамин-5'-фосфат (V) [9].

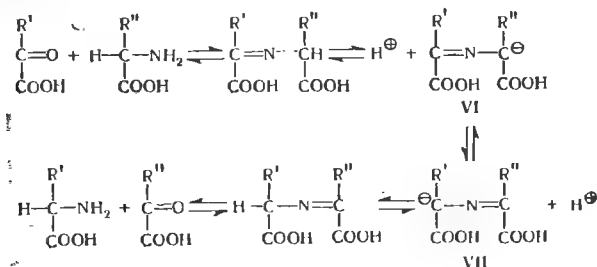


Основной биокаталитической формой производных В₆ является пиридоксаль-5'-фосфат, который в качестве кофермента пиридоксальных ферментов принимает участие в различных реакциях обмена аминокислот.

Первые данные о реакции между α -аминокислотами и α -кетокислотами были получены при изучении взаимодействия α -аминофенилуксусной и пировиноградной кислот [10]. Авторы наблюдали образование эквимолекулярных количеств бензальдегида, углекислоты и α -аланина согласно уравнению

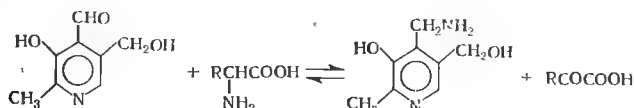


В 1937 г. была открыта реакция переаминирования между глутаминовой и пировиноградной кислотой, протекающая в биологических условиях [1]. Общая схема ферментативного переаминирования предполагала лабильзацию α -водородного атома реагирующей аминокислоты и возможность таутомерного перехода между промежуточными соединениями VI и VII.



Подобного типа процессы с участием пиридоксала были открыты Снеллом при изучении реакций между аминокислотами и пиридоксалем в водных растворах при физиоло-

гических значениях рН [11]. При этом наблюдалась обратимая реакция с образованием пиридоксамина и кетокислоты.



Обнаружение этой реакции позволило предполагать, что аналогичные функции пиридоксаль выполняет и в процессе энзиматического переаминирования согласно схеме:

Аминокислота А + пиридоксаль $\rightleftharpoons$ пиридоксамин + кетокислота А

Кетокислота Б + пиридоксамин $\rightleftharpoons$ пиридоксаль + аминокислота Б

Сумма: аминокислота А + кетокислота Б $\rightleftharpoons$ аминокислота Б + кетокислота А.

Коферментные функции пиридоксальфосфата были окончательно доказаны после выделения целого ряда ферментов — трансаминаз, декарбоксилаз, рацемаз и других ферментов, содержащих пиридоксальфосфат в качестве простетической группы (табл. 14).

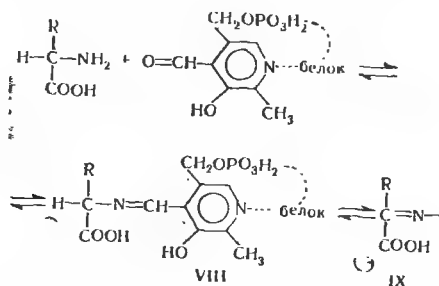
Таблица 14

Обнаружение коферментных функций пиридоксальфосфата
(по Браунштейну [12])

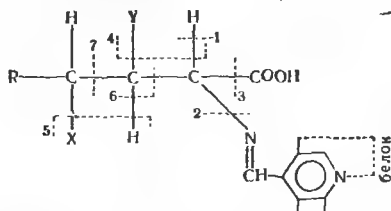
Год	Ферменты	Авторы и литературные источники
1945	Аминоферазы	Lichstein [13], Schlenk [14], Green [15]
1945	α -Декарбоксилазы	Umbreit [16], Baddiley [17]
1949	Аспартат- β -декарбоксилаза	C. P. Мардашев [18], Meister [19]
1952	Цистатионаза	E. B. Горяченкова [20], Binkley [21]
1952	Серин- и треонин-дегидразы	Reissig [22], Yanofsky [23], Metzler [24]
1954	Рацемазы	Wood [25]
1954	Гомосерин-дегидразы и гомосерин-изомеразы	A. E. Браунштейн, P. M. Азарх [26], Nisman [27]
1956	Диаминооксидазы	E. B. Горяченкова [28], Davison [29]

Все многообразные превращения аминокислот при участии пиридоксальфосфата были объяснены А. Е. Браун-

штейном и М. М. Шемякиным на основе теоретических представлений органической химии [2]. Согласно предложенной схеме, разнообразные превращения аминокислот, катализируемые пиридоксальвыми ферментами, связаны со способностью альдегидной группы пиридоксальфосфата образовывать шиффовы основания (азометины) с аминокислотами.

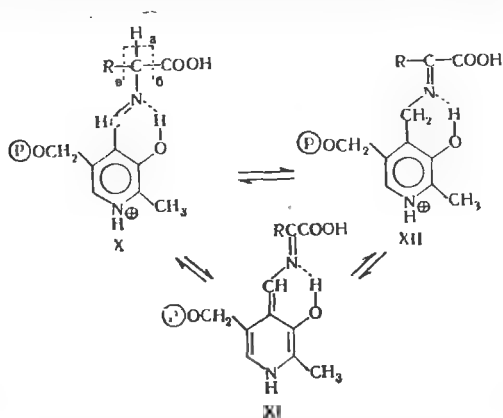


В азометине VIII по системе сопряженных связей происходит электронный сдвиг по направлению от α -углеродного атома аминокислоты к электрофильному атому азота пиридинового основания. Понижение электронной плотности у α -углеродного атома аминокислоты в азометинах типа VIII и IX приводит к поляризации и разрыву связей, причем характер и специфичность протекающих реакций определяется структурой белка.



Работами Snell и др. [3, 4] было показано, что практически все типы превращений аминокислот, вызываемые пиридоксальвыми ферментами, можно наблюдать в модельных системах с участием пиридоксальфосфата. В результате этих исследований удалось установить, что основными функциональными группами, необходимыми для проявления каталитической активности, являются формильная группа в положении 4 и гидроксильная группа в положении 3 пиридинового ядра. Дальнейшие исследования модельных

реакций неферментативного переаминирования позволили доказать наличие таутомерии оснований Шиффа.

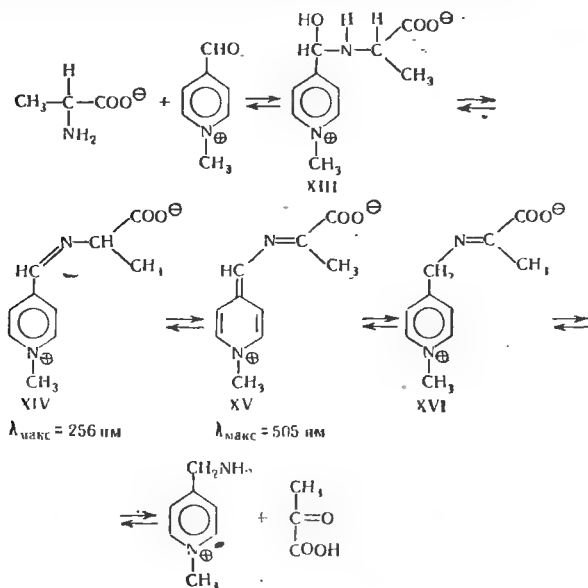


Snell [4] следующим образом характеризует свойства альдимины X: «В альдимине X сопряженная система двойных связей, распространяющаяся от α -углерода аминокислоты к электроотрицательной группе приводит к уменьшению электронной плотности у α -углеродного атома, ослабляя таким образом каждую из связей *a*, *b*, *c*. Это смещение электронов представляет собой «активацию аминокислоты под действием ферментной системы, содержащей пиридоксальфосфат».

С другой стороны, квантово-механические расчеты системы сопряженного имина, проведенные Pullman, позволили считать, что основной причиной ослабления связей у α -углеродного атома аминокислоты является не понижение электронной плотности за счет сопряжения, а значительный выигрыш в энергии резонанса [30]. В результате удаления протона образуется переходная форма XI, в которой имеет место объединение отдельных сопряженных фрагментов имина X в общую резонирующую систему, что дает выигрыш в энергии резонанса порядка 8 ккал/моль. Таким образом, по мнению Pullman, именно благодаря изменению энергии резонанса возможно протекание этой реакции.

В последнее время были получены интересные данные по структуре промежуточных продуктов в реакциях неферментативного трансаминирования [31]. При исследовании реакции между йодистым N-метил-4-формилпиридинием и аминокислотой этим авторам удалось наблюдать образова-

ние соединений, отвечающих по своим характеристикам истинным промежуточным продуктам реакции ферментативного трансаминирования и некоторых других энзиматических реакций. На основе изучения кинетики процесса и наблюдаемых спектральных изменений была установлена следующая последовательность отдельных стадий в реакции неферментативного трансаминирования [31]:



На первой стадии происходит образование первичного продукта присоединения — соответствующего карбиноламина XIII за счет атаки нуклеофильной аминогруппы аминокислоты по двойной связи альдегидной группы йодистого N-метил-4-формилпиридиния; затем наступает более медленная стадия дегидратации карбиноламина XIII с образованием альдимины XIV, обладающего максимумом поглощения в области 256 нм; далее происходит прототропная перегруппировка альдимины XIV в кетимин XVI через стадию промежуточно образующегося хиноидного изомера XV, обладающего длинноволновым максимумом поглощения при 505 нм (лимитирующая стадия), и, наконец, наступает заключительная стадия гидролиза кетимина XVI с выделением пировиноградной кислоты и йодистого N-метил-4-аминометилпиридиния.

Особая ценность изучения данной модельной реакции заключалась в том, что Вгисе и сотрудникам удалось наблюдать образование альдемина XIV с характерным максимумом поглощения при 256 нм и его трансформацию в соединение с длинноволновым максимумом поглощения при 505 нм (рис. 65).

Как указывалось выше, направление и характер реакций, катализируемых пиридоксальевыми ферментами, полностью определяются белковой частью фермента. Апофермент осуществляет строгий «ферментативный» контроль характера протекаемой реакции. Для объяснения специфичности действия пиридоксальных ферментов Данатом был выдвинут постулат, согласно которому направление протекаемой реакции должно определяться конформацией заместителей при связи α -углерод-азот в образующемся имине пиридоксальфата [32]. Согласно этой гипотезе, связь, подвергающаяся разрыву, должна располагаться перпендикулярно плоскости пиридинового кольца. Таким образом, в случае XVII будет происходить разрыв $\text{Ca}-\text{H}$ связи, в случае XVIII $\text{Ca}-\text{CH}_2\text{OH}$ и для XIX $\text{Ca}-\text{COOH}$.

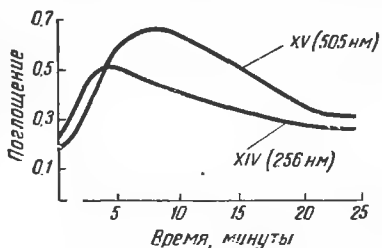
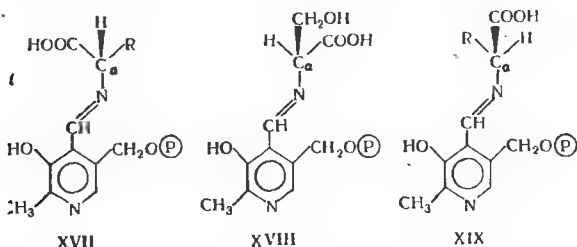


Рис. 65. Скорость образования и исчезновения альдемина XIV и хиноидной структуры XV в реакции неферментативного транамирования.



Для установления истинной пространственной ориентации субстрата в активном центре различных пиридоксальных ферментов необходимы дальнейшие исследования по стереохимии ферментативных реакций и различных фермент-субстратных комплексов соответствующих ферментов.

На протяжении последних 10 лет интенсивные исследования по механизму действия пиридоксальфосфата в модельных условиях тесно переплетались с работой по очистке и выделению в индивидуальном состоянии различных представителей класса пиридоксальных ферментов. В настоящее время уже получены в высокоочищенном состоянии и интенсивно исследуются многие пиридоксальные ферменты, в том числе аспартаттрансаминаза, пиридоксаминпируват-трансаминаза, декарбоксилаза глутаминовой кислоты, серинтрансоксиметилаза, триптофаназа и многие другие.

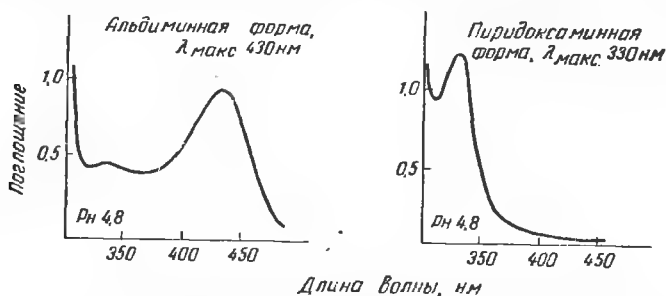
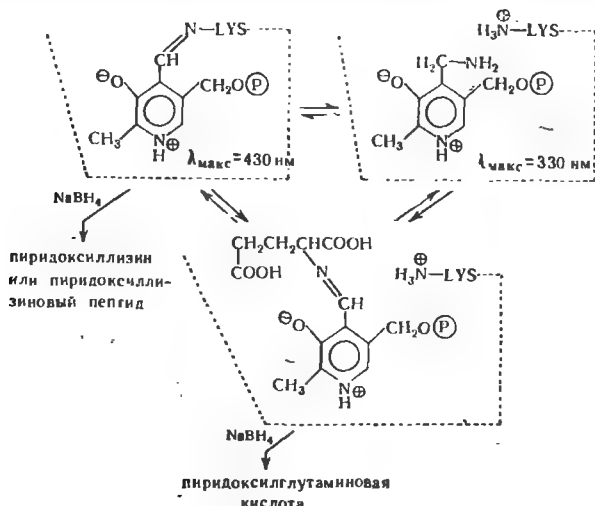


Рис. 66. Спектр поглощения и свойства альдиминной и пиридоксаминной форм аспартаттрансаминазы.

На примере одного из наиболее изученных ферментов этого класса — аспартаттрансаминазы — целесообразно рассмотреть комплекс данных по структуре и каталитической роли пиридоксальфосфата, по строению промежуточных фермент-субстратных комплексов и механизму протекающих реакций. Более подробные данные по механизму действия других пиридоксальных ферментов и каталитической роли пиридоксальфосфата можно найти в обзорах [4, 12, 33—36] и материалах международных симпозиумов по пиридоксальному катализу [37, 38.]

Для аспартаттрансаминазы были выделены и охарактеризованы две формы — альдиминная и пиридоксаминная, обладающие характерными спектрами поглощения [39] (рис. 66). В случае альдиминной формы кофермент — пиридоксальфосфат связан с ε-аминогруппой лизина в виде шиффова основания. Наличие альдиминной связи между карбонильной группой пиридоксальфосфата и ε-аминогруппой лизина было однозначно доказано восстановлением NaBH_4 с последующим выделением в зависимости от условий из

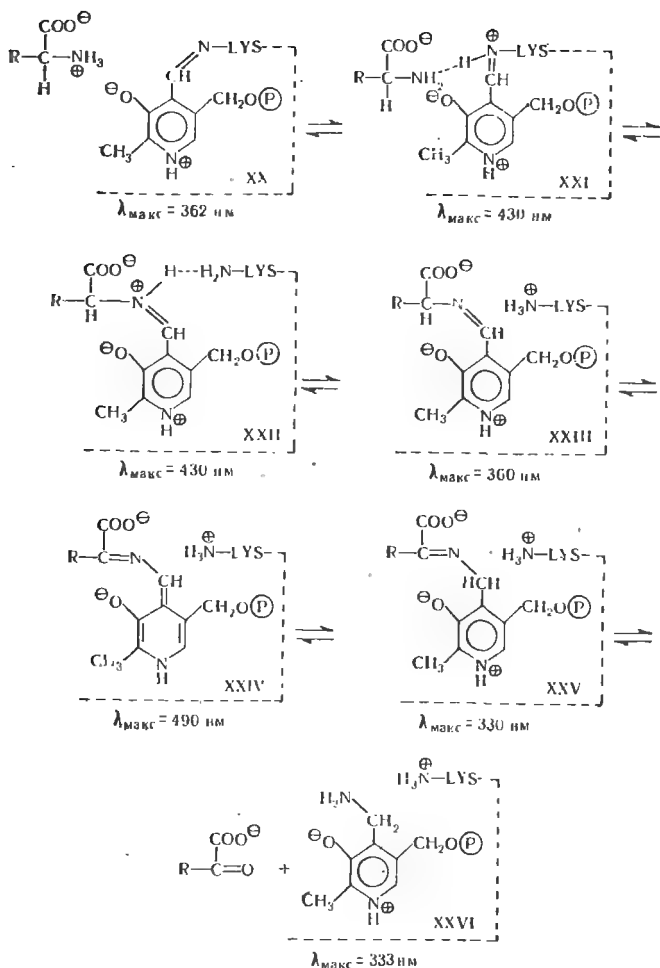
белкового гидролизата пиридоксиллизина или пиридоксилсодержащего тетрапептида [40, 41]. В пиридоксаминовой форме фермента кофермент присутствует в виде пиридоксаминфосфата и обладает высоким сродством по отношению к апоферменту, хотя и не имеет ковалентной связи с белком. При ферментативном трансаминировании происходит присоединение аминокислоты к альдиминной связи пиридоксальфосфата с лизином с последующим образованием шиффова основания между пиридоксальфосфатом и аминокислотой и освобождением свободной ϵ -аминогруппы лизина. Наличие шиффова основания между субстратом (глутаминовой кислотой) и пиридоксальфосфатом было также доказано восстановлением NaBH_4 и выделением из реакционной смеси пиридоксилглутаминовой кислоты [35]. После прототропной перегруппировки альдимины в кетимин и гидролиза последнего образуется продукт реакции — соответствующая кетокислота и пиридоксаминовая форма фермента. В случае обратной реакции пиридоксаминфосфат образует шиффово основание с кетокислотой, и продуктом реакции являются аминокислота и пиридоксальфосфат. Таким образом, реакция ферментативного трансаминирования следует по челночному механизму, причем кофермент периодически выступает в альдегидной или аминной формах. Эту равновесную реакцию легко сместить в любом направлении в зависимости от состава субстратной смеси.



Реакция ферментативного трансаминирования проходит через большое число промежуточных стадий, часть из которых уже обнаружена экспериментально, а другие ждут подтверждения. На примере изучения механизма действия аспартаттрансаминазы можно видеть большое значение использования целого комплекса методов — изучение реакций с аналогами субстратов (например, α -метил- и эритро- и трео- β -оксипарагиновыми и глутаминовыми кислотами) [35, 42, 43], изучение реакций со специфическими ингибиторами [44—46] — шаблонами фиксированных реакционных конформаций субстратов (например, циклоглутаминовыми кислотами [46], исследование реакций с аналогами кофермента [48], применение ряда оптических и спектральных методов (например, измерение дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма [34], методов быстрой кинетики, в том числе метода «остановленной струи» и температурного скачка [49] и многих других). На основе всей совокупности этих методов и данных по механизму неферментативного трансаминирования для аспартаттрансаминазы были охарактеризованы важнейшие промежуточные продукты в катализируемой этим ферментом энзиматической реакции.

На первой стадии, согласно [42], происходит связывание протонированной субстратной аминокислоты с непротонированной формой альдимины пиридоксальфосфата с лизинном (соединение XX). Образуется промежуточный фермент-субстратный комплекс, обладающий незначительным положительным эффектом Коттона и максимумом поглощения при 362 нм, и подготавливается перенос протона от аминокислотной группы аминокислоты к альдиминому фермента, так как для осуществления реакции нуклеофильного присоединения необходимо наличие неподеленной электронной пары на атоме азота аминокислоты. На следующем этапе происходит перенос протона с образованием протонированного фермент-субстратного комплекса (соединение XXI). Этот комплекс оптически не активен и обладает характерным максимумом поглощения при 430 нм.

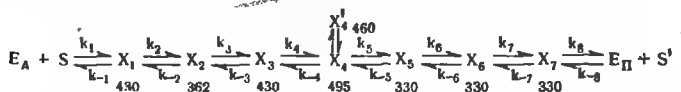
Затем образуется протонированное шиффово основание пиридоксальфосфата с аминокислотой (соединение XXII) с максимумом поглощения при 430 нм. На следующем этапе имеет место перенос протона к освободившейся ϵ -аминогруппе лизина и образование оптически не активного промежуточного продукта с максимумом поглощения при 360 нм (соединение XXIII). Трансформация соединения



XXIII в хиноидную структуру XXIV, представляющую собой таутомерную форму карбаниона, сопровождается появлением длинноволнового максимума поглощения в районе 490 нм. Прототропная перегруппировка и образование кетимина XXV с максимумом поглощения при 330 нм являются наиболее медленной стадией, и эта реакция лимитирует скорость всего процесса в целом. Завершающей стадией реакции ферментативного трансаминирования является выделение продукта реакции — соответствующей кетокислоты

и образование пиридоксаминовой формы фермента (положительный дихроизм и максимум поглощения при 333 нм).

В самые последние годы использование релаксационной спектроскопии позволило исследовать ферментативные процессы, совершающиеся в интервале времени до 10^{-10} сек. [50]. Применение этого метода для аспартаттрансаминазы подтвердило последовательность стадий разобранной выше реакции ферментативного трансаминирования [51]. В дополнение к этому при исследовании реакции трансаминирования *эритро*- β -оксиаспарагиновой кислоты в пределах времени от 10 мсек. до 24 часов Hammes определил 11 значений времени релаксации, из которых 8 оказались непосредственно связанными с реакцией трансаминирования [51]. Им была предложена следующая схема реакции трансаминирования, включающая 7 различных промежуточных комплексов:



где E_A и E_{II} — соответственно альдиминная и пиридоксаминовая форма аспартаттрансаминазы, S — *эритро*- β -оксиаспарагиновая кислота, S' — продукт переаминирования *эритро*- β -оксиаспарагиновой кислоты — α -кето- β -оксиянтарная кислота и X_1 — соответствующие промежуточные фермент-субстратные комплексы. Согласно Hammes, первые 3 промежуточных продукта (X_1 , X_2 , X_3) отражают процесс образования шиффова основания (X_1 — первоначальный комплекс, X_2 — измененное конформационное состояние X_1 , X_3 — собственно шиффово основание), X_4 и X_4^I — комплексы хиноидного типа, отличающиеся друг от друга конформационным или ионизационным состоянием, X_5 — кетимин и X_6 , X_7 — промежуточные (не связанные ковалентной связью) комплексы кетокислоты с ферментом [51]. В табл. 15 приведены основные характеристики промежуточных фермент-субстратных комплексов [51]. Как видно из этой таблицы, процент первых 3 промежуточных комплексов, присутствующих при насыщении фермента субстратом, невелик ($<10\%$), и стадией, лимитирующей скорость всего процесса, является превращение промежуточного комплекса X_5 .

На основе этих данных Hammes предположил, что реакция энзиматического трансаминирования для нативных субстратов включает по крайней мере 16 дискретных стадий

Характеристика промежуточных стадий трансаминирования
(по Hammes [51]).

Стадия (I)	K_1 (сек. ⁻¹)	K_1 (сек. ⁻¹)	K_1 (см ⁻¹)	X_1 (%)	Максимум по- глщения, нм
1	$3,10 \cdot 10^6$	$1,09 \cdot 10^4$	284	9,2	430
2	$1,58 \cdot 10^3$	$2,18 \cdot 10^3$	0,725	6,6	362
3	$2,09 \cdot 10^3$	$1,55 \cdot 10^3$	1,35	9,0	430
4	$1,29 \cdot 10^3$	$5,95 \cdot 10^2$	2,17	19,4	495
5	$1,91 \cdot 10^2$	$6,28 \cdot 10^3$	0,304	5,9	330
6	10,36	1,98	5,23	30,9	330
7	$1,9 \cdot 10^3$	$3,10 \cdot 10^3$	0,613	19,0	330

[51]. Наличие большого числа промежуточных фермент-субстратных комплексов позволяет объяснить высокую каталитическую эффективность аспартаттрансаминазы [51].

Разобранная выше последовательность реакций, катализируемых аспартаттрансаминазой, хорошо характеризует исключительную сложность механизма функционирования этого фермента. Другие аспекты молекулярных механизмов реакций ферментативного трансаминирования обсуждаются в главе, посвященной молекулярному механизму ферментативного трансаминирования.

В настоящее время еще ни для одного пиридоксалевого фермента полностью не установлена природа функциональных групп активного центра, их взаимное расположение, последовательность аминокислотных остатков важнейших участков белка и целый ряд других данных по структуре фермента. В связи с этим естественно думать, что реальный механизм ферментативного трансаминирования является гораздо более сложным. Совокупность свойств белкового компонента и кофермента определяет возможность усиления на 6—7 порядков каталитической активности, заложенную в самом пиридоксальфосфате.

ЛИТЕРАТУРА

1. Браунштейн А. Е., Крицман М. Г. Биохимия, 1937, 2, 859.
2. Браунштейн А. Е., Шемякин М. М. Биохимия, 1953, 18, 393.
3. Metzler D., Ikawa M., Snell E. J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 648.
4. Snell E. Vitamins and Hormones, 1958, 16, 77.
5. Gyorgy P. Nature, 1934, 133, 498.
6. Harris S., Folkers K. J. Am. Chem. Soc., 1939, 61, 1245, 3307; Kuhn R., Westphal K., Wendt G., Westphal O. Naturwiss., 1939, 27, 469.
7. Snell E. J. Am. Chem. Soc., 1944, 66, 2082.

8. *Gunsalus I., Bellamy W., Umbreit W. J.* Biol. Chem., 1944, **155**, 685.
9. *Rabinowitz J., Snell E. J.* Biol. Chem., 1947, **169**, 643.
10. *Heerbst, Engel L. J.* Biol. Chem., 1934, **107**, 505.
11. *Snell E. J.* Biol. Chem., 1944, **154**, 313.
12. *Braunstein A. E.* The Enzymes, 2, 113 (P. D. Boyer, H. Lardy, K. Mirback, Eds., Akad. Press, New-York, 1960).
13. *Lichstein H., Gunsalus I., Umbreit W. J.* Biol. Chem., 1945, **161**, 331.
14. *Schlenk F., Fischer A.* Arch. Biochem., 1945, **8**, 337.
15. *Green D., Leloir L., Nocito V. J.* Biol. Chem., 1945, **161**, 559.
16. *Umbreit W., Bellamy W., Gunsalus I.* Arch. Biochem., 1945, **7**, 185.
17. *Baddiley I., Gale E.* Nature, 1945, **155**, 727.
18. *Мардашев С. Р., Этингер Р. Н.* Биохимия, 1948, **13**, 402.
19. *Meister A., Sober H., Tice S. J.* Biol. Chem., 1951, **189**, 577.
20. *Горяченкова Е. В.* ДАН СССР, 1952, **85**, 603.
21. *Binkley F., Christensen G., Jensen W. J.* Biol. Chem., 1952, **194**, 109.
22. *Reissig J.* Arch. Biochem. Biophys., 1952, **36**, 234.
23. *Yanofsky C. J.* Biol. Chem., 1952, **198**, 343.
24. *Metzler D., Snell E. J.* Biol. Chem., 1952, **198**, 363.
25. *Wood W., Gunsalus I. J.* Biol. Chem., 1951, **190**, 403.
26. *Браунштейн А. Е., Азарх Р. М.* ДАН СССР, 1952, **85**, 385.
27. *Nisman B., Cohen G., Wiesendanger S., Hirsch M.* Compt. rend., 1954, **298**, 1342.
28. *Горяченкова Е. В.* Биохимия, 1956, **21**, 247.
29. *Davison A.* Biochem. J., 1956, **64**, 546.
30. *Perult A., Pullman B., Valdemoro C.* Biochim. Biophys. Acta, 1961, **46**, 555.
31. *Maley I., Bruice T. J.* Am. Chem. Soc., 1968, **90**, 2843.
32. *Lunathan H.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1966, **55**, 712.
33. *Guirard B., Snell E.* Comprehensive Biochem., 1964, **15**, 138.
34. *Braunstein A.* Vitamine and Hormone, 1964, **22**, 451.
35. *Fasella P.* Ann. Rev. of Biochem., 1967, **36**, 185.
36. *Ivanov V. I., Karpeiski M. Ya.* Adv. of Enzymology, 1969, **32**, 117.
37. *Snell E., Fasella P., Braunstein A., Fanelli R.* Eds. Chem. Biol. Aspects Pyridoxal Catalysis, Pros. Symp. Intern. Union Biochem., Rome, Pergamon Press. Oxford, 1963.
38. *Химия и биология пиридоксалевого катализа. Под ред. А. Е. Браунштейна, Е. С. Северина, Э. Э. Снелла, Ю. М. Торчинского. М., 1968.*
39. *Jenkins W., Yphantis D., Sizer I. J.* Biol. Chem., 1959, **234**, 51.
40. *Hughes R., Jenkins W., Fisher E.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1962, **48**, 1615.
41. *Поляновский О. Л., Кейл Б. А.* Биохимия, 1963, **28**, 373.
42. *Fasella P., Giartosio A., Hammes G.* Biochemistry, 1966, **5**, 197.
43. *Mannig I., Khomutov R., Fasella P.* European J. Biochem., 1968, **2**, 199.
44. *Хомутов Р. М., Северин Е. С.* В кн.: Современные проблемы химии пептидов и белков. М., 1969, с. 134.
45. *Хомутов Р. М., Северин Е. С., Ковалева Г. К., Гуляев Н. Н., Саценко Л. П.* В кн.: Химия и биология пиридоксалевого катализа. М., 1968, с. 381.
46. *Gnuchev N. V., Khomutov R. M., Severin E. S.* Structure and Function Biopolymers, Intern. Symp. Macromol. Chem. Section B 2. 10, Toronto, 1968.

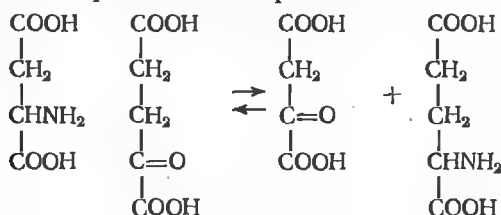
47. Хомутов Р. М., Ковалева Г. К., Северин Е. С., Вдовина Л. В. Биохимия, 1967, 32, 900.
 48. Bocharov A. L., Ivanov V. I., Karpeisky M. Ya, Mamaeva O. K., Florentiev V. L. Biochem. Biophys. Reserch. Comm., 1968, 30, 459.
 49. Фаселла П. В кн.: Химия и биология пиридоксалевого катализа. М., 1968, с. 7.
 50. Hammes G. Adv. Prot. Chem., 1968, 23, 1.
 51. Hammes G., Haslam I. Biochemistry, 1969, 8, 1591.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ТРАНСАМИНИРОВАНИЯ

В. И. ИВАНОВ

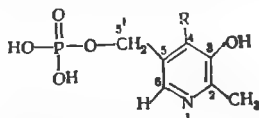
Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва

Аспартат-аминотрансфераза (ААТ, КФ 2.6.1.1) катализирует достижение равновесия в реакции



L-аспартат + λ -кетоглутарат $\rightleftharpoons$ щавелевоуксусная кислота + *L*-глутамат

ААТ содержит кофермент, который может существовать в 2 формах, переходящих друг в друга в ходе реакции,



R: CHO — пиридоксаль-5'-фосфат (ПЛФ)

R: CH₂NH₂ — пиридоксамин-5'-фосфат (ПМФ).

Согласно механизму, предложенному А. Е. Браунштейном и М. М. Шемякиным [1], а также Metzler, Ikawa, Snell [2], трансаминирование протекает по «челночному» механизму¹.

Хотя в настоящее время справедливость этого механизма для трансминаз не вызывает сомнения, необходима его

¹ См. в данном сборнике статью Е. С. Северина.

дальнейшая детализация, чтобы понять высокую специфичность и эффективность ферментативного катализа.

Говоря об эффективности ферментативного катализа, мы должны сравнивать скорости ферментных реакций со скоростями соответствующих реакций, протекающих в отсутствие фермента. Неферментные системы, моделирующие какое-либо превращение и содержащие низкомолекулярные катализаторы, называются модельными системами. Если в модельной системе рассматриваемое превращение осуществляется через те же промежуточные химические соединения, что и в ферментной системе, то такую модельную систему называем **конгруэнтной**.

Для ААТ конгруэнтную систему впервые получили Вгуйсе и др. [3, 4].

Они показали, что добавление слабого основания, которое может катализировать изомеризацию альдимины в кетимин, в модельную систему, содержащую субстраты, пиридоксаль (или его 2,5-незамещенный аналог), приводит к полному исключению всех реакций, не связанных с отщеплением α -водорода. Реакция целиком направляется по пути переаминирования (хотя и нестереоспецифичного из-за рацемизации).

Имея такую систему, мы получаем возможность охарактеризовать роль белкового компонента ферментной реакции. Сравнение констант скоростей, полученных в конгруэнтной системе Вгуйсе и др. для индивидуальных ионных форм реагентов [3], с константами соответствующих стадий реакции, катализируемой ААТ [5], позволило сформулировать следующую гипотезу [6].

Высокая специфичность и эффективность реакции, катализируемой ААТ, по сравнению с неферментной системой, содержащей все необходимые низкомолекулярные катализаторы (конгруэнтная модельная система), достигаются с помощью следующих трех факторов:

- 1) стабилизация наиболее реакционноспособных для **данной** стадии реакции ионных форм кофермента и субстрата;
- 2) ориентации реагирующих групп по координате реакции **данной** стадии;
- 3) осуществления факторов (1) и (2) на **каждой** стадии многостадийной ферментной реакции.

Требование (1) связано с тем, что реагенты в модельной системе могут присутствовать в разнообразных ионных формах и конформациях, имеющих отнюдь не одинаковую реакционную способность. Требование (2) отражает тот факт,

что столкновение реагентов, находящихся пусть даже в наиболее реакционноспособных формах, приведет к акту реакции только при определенной взаимной ориентации реагентов. Наконец, фактор (3) необходим из-за того, что в многостадийной реакции различные последовательные стадии реакции могут требовать различных, порой альтернативных, условий для своей реализации. Поэтому фермент должен представлять собой машину, умеющую «переключать» условия, оптимальные для одной стадии на условия, оптимальные для другой стадии.

Рассмотрим пространственную модель работы активного центра ААТ, которая показывает, как стабилизация (1), ориентация (2) и изменение условий (3) могут реализовываться в этом конкретном случае. Более подробное описание модели и ее экспериментальное обоснование см. [6].

Предлагаемая модель

Исходное состояние кофермента в белке ААТ изображено на рис. 67 и схеме.

Существование ковалентной связи формальной группы ПЛФ с ϵ -NH₂-группой остатка лизина доказано в работе [7]. Аргументы за наличие ионной (или водородной) связи фосфатной группы с белком приведены в [8]. Известно

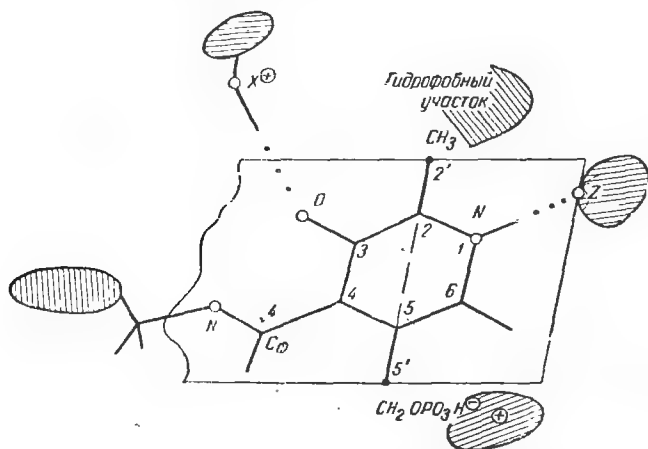
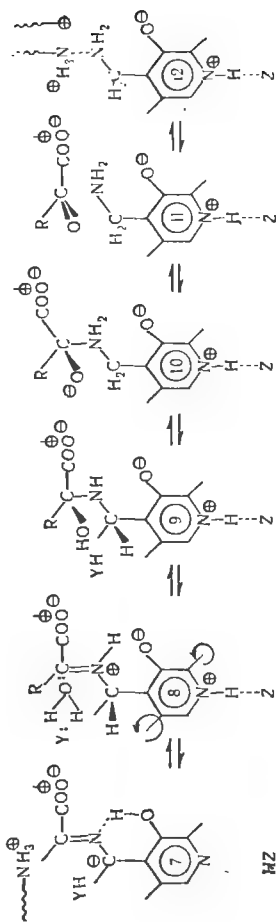
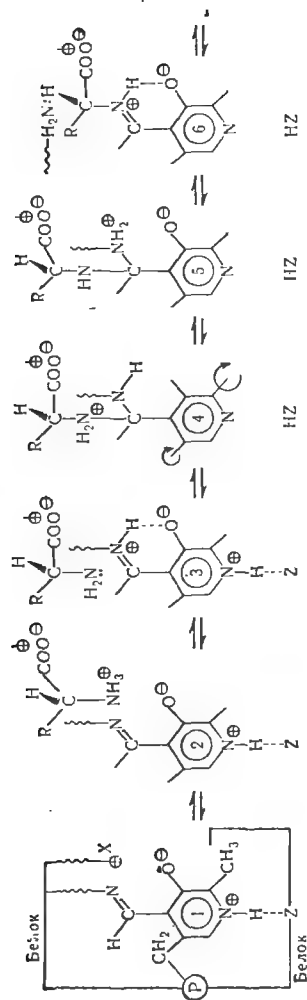


Рис. 67. Связи кофермента с белком в отсутствие субстратов в активной форме фермента, pH 8,0 [см. схему 1 (1)].



Схема

также, что в ферментативно активной форме ААТ фенольная группа кофермента ионизована ($pK_a=6,2$) [9]. Водородная связь между атомом азота кольца и протонодонорной группой белка была постулирована для того, чтобы объяснить очень большое различие в величинах pK_a «внутреннего» альдимида ААТ (6,2) и соответствующих модельных альдимидов ($pK_a \sim 11$) [9]. Однако, как показывают опыты с метилированными по атому азота кольца альдимидами, положительный заряд на азоте снижает pK_a лишь до величины $\sim 8,0$. Поэтому, мы предположили, что в активном центре в окрестности фенольного гидроксила присутствует катионная группа белка X^+ , которая и вызывает дальнейшее понижение pK_a до величины 6,2 [6]. Наконец, метильная группа кофермента может быть связана гидрофобными силами с алифатическими остатками апофермента [10].

Что касается субстратов, то в условиях рН-оптимума ферментативной реакции все их диссоциирующие группы (карбоксильные и аминные) находятся в ионизованном состоянии.

Рассмотрим теперь, как, согласно предлагаемой модели, осуществляется ферментативная реакция, в которой субстратом является аспарат.

1. Аминокислота присоединяется двумя отрицательно заряженными карбоксилатами к определенным образом ориентированным катионным группам белка, что определяет субстратную специфичность. Субстрат находится в конформации со сближенными карбоксильными группами; это следует из того, что малеиновая (но не фумаровая) кислота является конкурентным ингибитором ААТ [11].

2. α -Карбоксильная группа субстрата взаимодействует с той самой катионной группой белка X^+ , которая образует связь с фенольным гидроксидом кофермента, являясь одним из двух факторов, понижающих pK_a во внутреннем альдимида ААТ (см. схему [2]).

3. Нейтрализация группы X^+ карбоксильной группой субстрата снимает действие этого фактора и pK_a «внутреннего альдимида» повышается до значения $\approx 8,0$. Одновременно нейтрализация α -COOH группы аминокислоты понижает основность аминогруппы с 9,6 до 7,4 [12].

4. Этим самым создается возможность для кофермента акцептировать протон NH_3^+ -группы субстрата. В результате переноса протона аминогруппа приобретает способность присоединяться по связи C—N кофермента, а поляризация этой связи за счет протонирования атома азота иминогруп-

6. Следующая стадия — изомеризация субстратного альдими́на в кетимин. В ряде работ предполагается, что отрыв

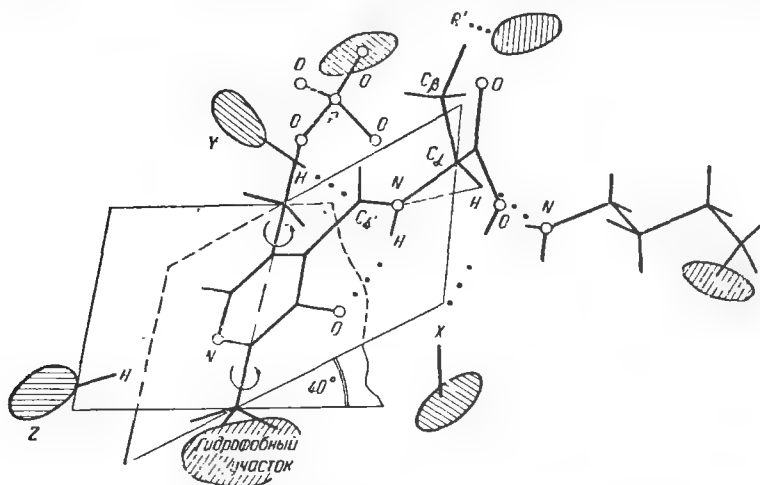


Рис. 69. Фермент-субстратный комплекс 6 [см. схему 1 (6)].

протона от α -углерода, а также протонирование атома C_4 осуществляется 2 группами (основной и кислой), принадлежащими белку. В рассматриваемой модели освободившаяся ϵ - NH_2 -группа остатка лизина акцептирует протон от α -углеродного атома субстрата. Образуется стабилизированный большой системой сопряженных связей карбанион (см. схему [7]). Известно, что координата реакции диссоциации протона атома C_α лежит в плоскости, перпендикулярной плоскости кольца ПЛФ [14]. Необходимая для этого конформация вокруг связи $C_\alpha-N$ уже была обеспечена фиксацией α - $COOH$ -группы субстрата (рис. 68).

7. Вследствие поворота кофермента атом C_4' получает возможность реагировать с протонодонорной группой белка УН. Происходит протонирование, в результате которого возникает кетимин. Атом C_4' кетимина является тетраэдрическим. Одиночные связи вокруг него допускают вращение.

Кольцо кофермента снова может повернуться вокруг оси «2—5» в исходную плоскость. При обратном повороте атом азота кольца протонируется группой ZH, что увеличивает кислотность фенольной группы кофермента. Ее протон диссоциирует и, присоединяясь к атому азота иминогруппы, катализирует атаку воды на атом C_{α} . Кроме того, отдавшая протон группа Y может оттягивать протон молекулы воды, создавая весьма реакционноспособный гидроксид-ион (см. схему [8, 9]).

8. Кетимин гидролизует и получается продукт реакции — кетокислота, и связанный с белком ПМФ. Аминогруппа ПМФ оказывается в непосредственной близости от 2 катионных групп активного центра: ϵ -NH₂-группы лизина, который связывал ПЛФ, и катионной группы X⁺. Из-за этого основность аминогруппы ПМФ, равная в обычных условиях 10,5, сильно понижена; аминогруппа остается неионизированной и, следовательно, способной взаимодействовать с кетосубстратом в обратной реакции (см. схему [11, 12]).

Предложенная модель позволяет понять ряд хорошо известных, но не объясненных свойств ААТ.

1. Почему ферментативно активной формой ААТ является форма с ионизованным гидроксилом кофермента, хотя в модельных системах наибольшую активность имеет протонированное основание Шиффа?

Согласно рассмотренной модели, необходимое состояние ионизации достигается непосредственно перед стадией, когда оно требуется.

2. Почему дикарбоновые кислоты, являющиеся конкурентными ингибиторами ААТ, повышают pK_a внутреннего альдимины до величин $\sim 8,0$?

Потому что дикарбоновая кислота нейтрализует катионную группу, расположенную в окрестности фенольного гидроксила кофермента.

3. Почему не наблюдается переаминирования между коферментом и связывающим его остатком лизина?

В субстратном альдимине, согласно модели, в изомеризации участвует группа, которая освобождается лишь при возникновении этого альдимины (ϵ -NH₂-группа лизина).

4. Почему удельная активность ААТ не зависит от pH (в пределах 6,0—9,5) [5]?

Потому что ни на одной стадии реакции в данной модели протоны не акцептируются из среды и не выходят в среду;

все переносы протонов происходят только между компонентами системы.

5. Почему фермент-субстратный альдимин (рис. 69), который по своей химической структуре весьма близок к «внутреннему» альдимину ААТ, не обладает в отличие от него оптической активностью [15, 16]?

Потому что оптическая активность внутреннего альдимина обусловлена взаимодействием кофермента с белком, а при возникновении субстратного альдимина, согласно модели, кофермент занимает другое положение и из прежних связей с белком нетронутыми остаются лишь две (концы оси поворота).

ЛИТЕРАТУРА

1. Браунштейн А. Е., Шемякин М. М. Биохимия, 1953, 18, 393.
2. Metzler D., Ikawa M., Snell E. J. Am. Chem. Soc., 1954, 26, 648.
3. French T., Auld D., Bruice T. Biochemistry, 1965, 4, 77.
4. Thanassi J., Bulter A., Bruice T. Biochemistry, 1965, 4, 1463.
5. Фаселла П. В кн.: Химия и биология пиридоксалевого катализа. М., 1968.
6. Ivanov V. I., Karpeisky M. Ya. Advances in Enzymology, 1969, 32, 21.
7. Hughes R., Jenkins W., Fisher E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1962, 48, 1615.
8. Wada H., Snell E. J. Biol. Chem., 1962, 237, 145.
9. Sizer I., Jenkins W. В кн.: Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis. Pergamon Press. Oxford, 1963, 126.
10. Bocharov A. L., Ivanov V. I., Karpeisky M. Ya., Mamaeva O. K., Florentiev V. L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1968, 30, 459.
11. Jenkins W., Iphantis D., Sizer I. J. Biol. Chem., 1959, 234, 51.
12. Мартин Р. Введение в биофизическую химию. М., 1966, с. 90.
13. Nagano K., Metzler D. J. Am. Chem. Soc., 1967, 89, 2891.
14. Dunathan H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 55, 712.
15. Торчинский Ю. М., Коренева Л. Г. Биохимия, 1963, 28, 1087.
16. Иванов В. И., Бреусов Ю. Н., Карпейский М. Я., Поляновский О. Л. Молек. биол., 1967, 1, 588.

СИНТЕЗ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В₆, ИХ КОФЕРМЕНТНЫХ ФОРМ И АНАЛОГОВ

В. Л. ФЛОРЕНТЬЕВ

Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва

Проблема синтеза витаминов группы В₆ — пиридоксаль-5'-фосфата и их аналогов — распадается в принципе на четыре части, каждая из которых представляет самостоятельный интерес.

I. Синтез пиридинового ядра с необходимыми заместителями и превращение полученных соединений в пиридоксин [2-метил-3-окси-4,5-бис-(оксиметил)пиридин, ПН].

II. Переход от ПН к другим двум формам витамина В₆ — пиридоксалу (2-метил-3-окси-4-формил-5-оксиметилпиридину, ПЛ) и пиридоксамину (2-метил-3-окси-4-аминометил-5-оксиметилпиридину, ПМ).

III. Фосфорилирование полученных соединений с целью получения двух форм кофермента — пиридоксаль-5'-фосфата (ПЛФ) и пиридоксамин-5'-фосфата (ПМФ).

IV. Синтез различных производных ПН, ПЛ, ПМ и ПЛФ, необходимых для исследования механизма действия пиридоксальных ферментов, а также представляющих самостоятельный интерес в качестве потенциальных биологически активных веществ.

Синтез пиридоксина и его аналогов

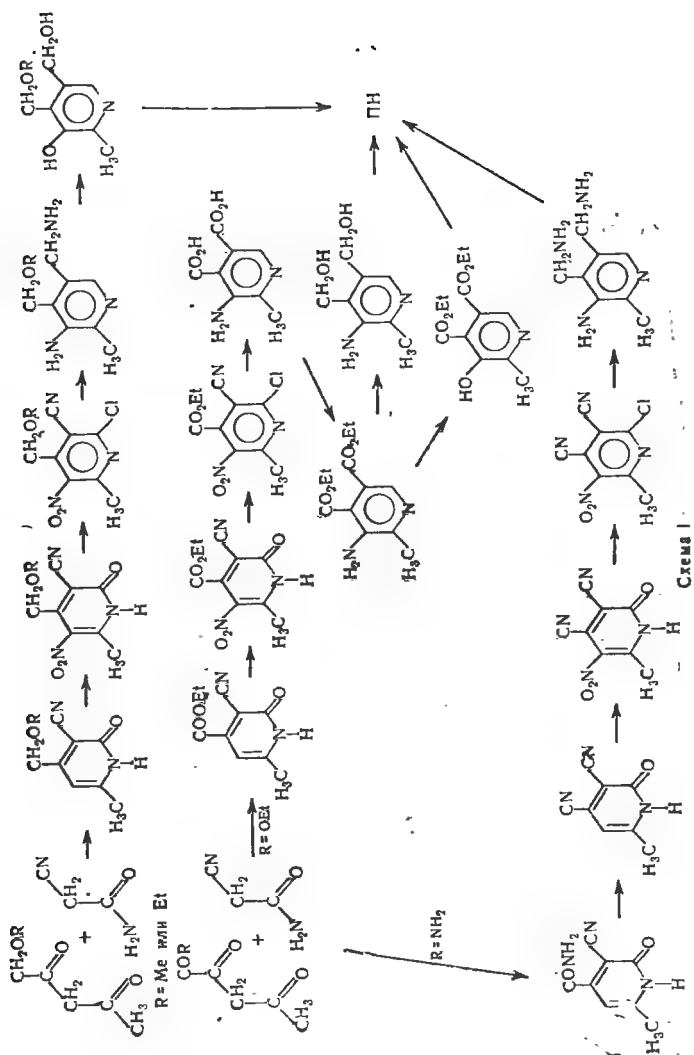
Первый синтез ПН был опубликован в 1939 г. одновременно Harris, Folkers [1, 2] и Kuhn и др. [13].

В дальнейшем во многих странах усиленно разрабатывались пути получения синтетического витамина В₆. Материал, имеющийся к настоящему времени, можно объединить в 4 основные схемы по способу создания пиридинового ядра, а именно: 1) синтез пиридоксина из ациклических соединений; 2) из замещенных хинолинов или изохинолинов; 3) из фурановых соединений; 4) конденсацией оксазолов с диенофилами.

Разработка первых трех методов в основном была закончена к 60-му году. Детальное рассмотрение каждой схемы проведено в многочисленных обзорах и монографиях [4—14]. Другие литературные источники относятся к усовершенствованию отдельных методов и будут приведены далее. Четвертая схема усиленно разрабатывается в последние годы и, на наш взгляд, является наиболее перспективным методом получения как самого ПН, так и его аналогов.

1. **Синтез пиридоксина из ациклических соединений.** Синтез ПН, ключевой стадией которого является конденсация цианацетамида с β-дикарбонильными соединениями (схема 1), наиболее тщательно разработан и служит одним из основных промышленных способов получения витамина В₆. Работы последних лет посвящены дальнейшему улучшению стадий нитрования, восстановления и гидролиза [15—18].

Из «классических» обсуждаемый метод предоставляет наибольшие возможности для синтеза аналогов ПН. По



заслуживает самого пристального внимания. В последние годы появились работы, в которых достигнуто заметное усовершенствование процесса [26—28]. Приведен также единственный пока пример использования этой схемы для получения аналога ПН—2-нор-ПН.

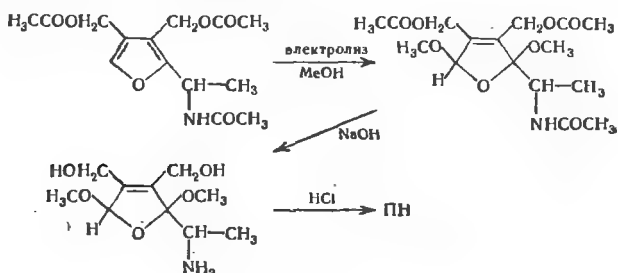


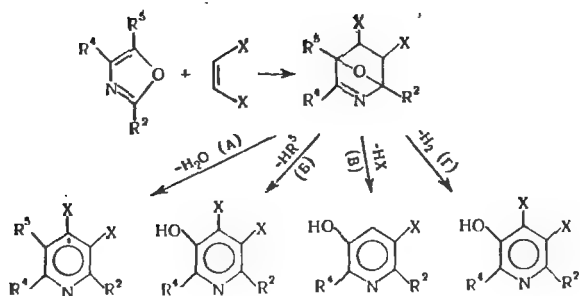
Схема 3

4. Синтез пиридоксина конденсацией оксазолов с диенофилами. В конце 50-х годов Г. Я. Кондратьева [29, 30] показала, что оксазолы легко вступают в диеновую конденсацию, образуя с хорошими выходами замещенные пиридины. Эти работы положили начало новому этапу в изучении синтеза витамина В₆. В последние годы подавляющее большинство исследований в области синтеза ПН связано с гетеродиеновым синтезом оксазолов. Накоплен большой экспериментальный материал, который частично систематизирован в двух обзорах [31, 32].

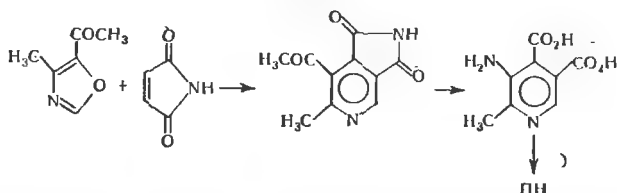
Прежде чем перейти непосредственно к рассмотрению работ, связанных с использованием гетеродиенового синтеза для получения ПН и его аналогов, необходимо кратко остановиться на некоторых особенностях этой реакции. Более подробные данные приведены в работе [32].

Взаимодействие оксазолов с диенофилами в зависимости от строения исходных соединений может протекать по четырем основным направлениям (см. формулу на стр. 224). По направлению А реагируют 5-алкилоксазолы с малеинимидом и малеиновым ангидридом. Для 5-алкокси-, 5-цианоксазолов и подобных соединений характерно направление Б. Направления В и Г осуществляются в случае реакций 5-незамещенных оксазолов, причем последнее — преимущественно в присутствии окислителей (нитробензол, перекись водорода).

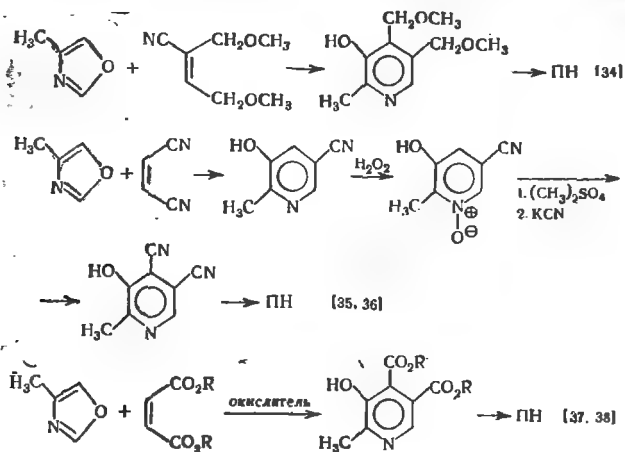
Направление А для синтеза ПН представляет незначительный интерес, поскольку введение оксигруппы в положение



ние 3 пиридинового цикла сопряжено со значительными трудностями. Единственную попытку, предпринятую в этом направлении [33], нельзя признать удачной ввиду сложности метода и низких выходов на первых двух стадиях.



Что касается синтеза аналогов ПН, то данная схема с успехом может быть применена только для получения аналогов, модифицированных по положению 3 пиридинового ядра



В настоящее время предложены следующие 3 схемы использования направлений В и Г для получения ПН.

Первый синтез представляет лишь теоретический интерес, так как выход на стадии диенового синтеза весьма низок. Второй, несмотря на многостадийность, может найти применение при получении меченного по углероду ПН.

Гетеродиеновый синтез по направлению Б представляет удобный метод синтеза ПН. К его достоинствам следует отнести: высокую активность оксазолов, хорошие выходы конечных продуктов и простоту метода. Не удивительно поэтому, что усилия исследователей были направлены на разработку именно этой реакции (схема 4).

Все многообразие синтетических путей можно разбить в основном на три группы. К 1-й относятся конденсации 5-алкокси-[39—44], 5-этоксикарбонилокси [45—47] и 5-циан-4-метилоксазола с активными диенофилами типа диалкилмалеата, диалкилфумарата или фумаронитрила. В этом случае реакция проводится в относительно мягких условиях (60—110°) и выходы конечных продуктов весьма высоки (75—85%). Дальнейшее превращение полученных соединений в ПН не составляет труда, поскольку оно было тщательно разработано еще в «классических» синтезах ПН.

Вторая группа методов заключается в конденсации оксазола с бутендиолом и его производными. Реакция с самим бутендиолом протекает с низким выходом, поэтому в качестве диенофилов обычно применяются его производные, такие, как: 1,4-диацилокси- [39, 50], 1,4-диметокси- [39, 51], 1,4-метоксиметокси-, 1,4- α -тетрагидрофурилокси-, 1,4- α -тетрагидропирилокси-, 1,4-метоксиэтокси-бутены-2 [52]; циклические эфиры угольной, кремниевой, фенилборной кислот [53]; 2,5-дегидрофуран [39, 43, 48, 29, 51] и 2-замещенные 4,7-дигидро-1,3-диоксепины [54—57]. В этом случае реакция проводится в более жестких условиях (автоклав, 150—200°) и выходы продуктов диенового синтеза несколько ниже, чем в предыдущих синтезах. Однако преимуществом этой группы методов является простота — ПН получается всего в 2 стадии.

Третья группа методов разрабатывается японскими авторами [58—60]. В данном случае в качестве диена используется 5-этокси-4-оксазолилуксусная кислота и ее этиловый эфир. Своеобразие гетеродиенового синтеза заключается в том, что процесс ароматизации аддукта сопровождается декарбоксилированием α -пиридилуксусных кислот.

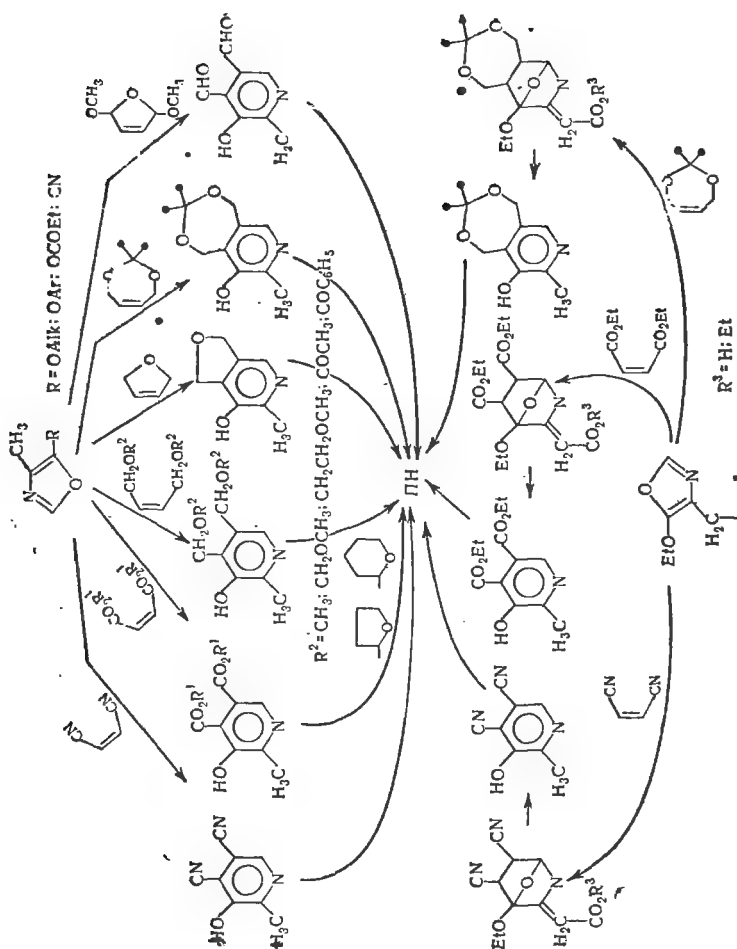


Схема 4

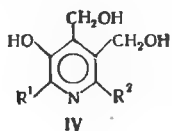
Особняком стоит опубликованная недавно конденсация 4-метил-5-этоксиксазола с 2,5-диметокси-2,5-дигидрофураном [61, 62]. Продукт этой реакции — 2-метил-3-окси-пиридин-4,5-диальдегид может быть легко превращен в ПН.

Сказанное выше можно суммировать в виде кратких выводов.

1. Из различных направлений гетеродиенового синтеза оксазолов наиболее удобным для препаративного получения ПН является направление Б (см. схему 4).

2. В лабораторных условиях удобнее использовать такие активные диенофилы, как диалкилмалеаты или диалкилфумараты, в то же время в промышленном синтезе ПН предпочтительно применение в качестве диенофилов производных бутен-2-диола-1,4.

Гетеродиеновый синтез по направлению Б был успешно использован для получения алкиланалогов витамина В₆: 2-нор-ПН (IV а) [63—67], 2-нор-6-метил-ПН (IV б) и 6-метил-ПН (IV в) [66, 65], 2'-метил-ПН (IV г) [67], 2',2'-диметил-ПН (IV д) и 2'-*н*-пропил-ПН (IV е) [65, 66].



а) $R^1 = R^2 = H$

б) $R^1 = H; R^2 = CH_3$

в) $R^1 = R^2 = CH_3$

г) $R^1 = C_2H_5; R^2 = H$

д) $R^1 = \text{изо-}C_3H_7; R^2 = H$

е) $R^1 = \text{н-}C_4H_9; R^2 = H$

В заключение следует сказать, что ограничения, заключающиеся в малой доступности исходных оксазолов, первоначально сдерживавшие развитие этого метода, в настоящее время в значительной степени преодолены благодаря проведению ряда успешных исследований в области синтеза оксазолов [47, 50, 51, 56, 57, 68, 69].

Синтез пиридоксамина, пиридоксала и их аналогов

К настоящему времени в литературе описано несколько методов прямого получения ПМ и ПЛ (схема 5).

ПМ получен либо аминированием (жидкий аммиак, 140°) 2-метил-3-окси-4-метоксиметил-5-оксиметилпиридина [70], либо восстановлением нитрила 2-метил-3-окси-5-оксиметил-изоникотиновой кислоты [71, 72]. Весьма интересен синтез ПЛ конденсацией цианацетамида с 1,1-диметоксипентенди-



оном-2,4 [73]. Гетеродиеновая конденсация 4-метил-5-этоксиксазола с 4-ацетоксикротоновым альдегидом также приводит к ПЛ, но с низким выходом [51]. Однако возможности прямого синтеза этих двух форм витамина В₆ ограничены сложностью методов и невысокими выходами. Поэтому ПЛ и ПМ чаще получают из ПН. Методы перехода от ПН к другим двум формам витамина В₆ к настоящему времени отработаны достаточно тщательно. Отправной точкой таких превращений является окисление ПН до ПЛ. Окисление обычно проходит достаточно селективно и затрагивает в основном 4-оксиметильную группу. Вопрос о причинах столь различной реакционной способности 4- и 5-оксиметильных групп окончательно не разрешен, однако, вероятно, решающим фактором является общий кислотный катализ фенольным гидроксидом. Этот вывод подтверждается тем, что при окислении аналога ПН, не имеющего оксигруппы в третьем положении, — 3-дезоксипН, были получены оба изомерных альдегида, причем соотношение 4- и 5-альдегидов равно 1 : 6 [74].

В качестве окислителя первоначально применяли перманганат калия [70]. Однако при этом ПЛ был получен с низким выходом. Лучшие результаты дает окисление ПН активной двуокисью марганца. По способу приготовления различается несколько типов двуокиси марганца [75—78]. Сравнение литературных данных показывает, что ни один из этих окислителей не имеет существенных преимуществ. Обычно окисление проводят в разбавленной серной кислоте эквимолекулярным количеством двуокиси марганца.

Полученный при окислении ПЛ выделяют из реакционной массы в виде производных: оксима [65, 66, 79], шиффовых оснований с ароматическими аминами [65, 66, 80], бисульфитного производного [81, 82]. Гидрирование оксима ПЛ приводит к ПМ. Сам ПЛ получают, действуя азотистой кислотой на оксим ПЛ или кислотным гидролизом оснований Шиффа и бисульфитного производного. Последний метод, на наш взгляд, является наиболее удобным методом синтеза ПЛ. Недавно Korytnyk и др. опубликовали работу, в которой приводят заслуживающий внимания метод окисления ПН двуокисью марганца [83]. Особенностью этой методики является то, что из реакционной смеси выделяют непосредственно альдегид. В случае аналогов ПН, модифицированных по положению 5, хорошие результаты дает окисление двуокисью марганца в неполярных растворителях [78, 84].

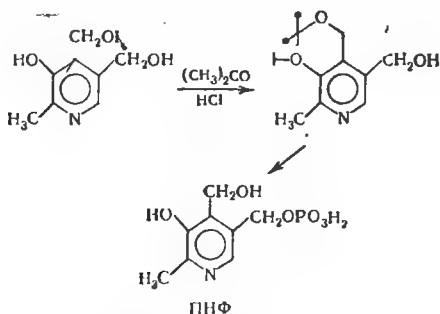
Синтез 5'-фосфорных эфиров

Трудности в синтезе 5'-фосфорных эфиров витамина В₆ связаны в первую очередь с наличием по крайней мере 2 оксигрупп, характеризующихся примерно одинаковой реакционной способностью. Это заставляет исследователей либо применять легко снимаемую защиту, либо фосфорилировать малоактивными, но избирательными фосфорилирующими агентами.

Последний метод более прост, но все же приводит к смеси фосфатов, что вынуждает разрабатывать сложные методы выделения и очистки. Введение защитных группировок дает возможность провести фосфорилирование исключительно по требуемой функции. Но в этом случае возникает проблема выбора защиты, которая должна быть устойчива в условиях фосфорилирования и в то же время легко сниматься после проведения этерификации, что затрудняется относительной лабильностью самих 5'-фосфатов [76]. Последнее свойство фосфорных эфиров витамина В₆ не дает возможности ввести фосфатную группу на ранних стадиях синтеза.

1. Пиридоксин-5'-фосфат. Поскольку свойства 4- и 5-оксиметильных групп ПН достаточно близки, прямая этерификация диола дает неудовлетворительные результаты [85, 86].

В 1952 г. Baddiley и Mathias провели фосфорилирование ПН, у которого 3- и 4-оксигруппы защищены циклическим ацеталем — α , β -О-изопропилиденпиридоксина [87].



Изопропилиденовая защита удовлетворяет всем необходимым требованиям, так как она закрывает обе конкурирующие оксигруппы и относительно легко снимается в кислых средах.

Метод фосфорилирования α ,⁴³О-изопропилиден-ПН хлорокисью фосфора в водных растворах [87], примененный впоследствии для синтеза меченного по фосфору ПНФ [88], нельзя признать полностью удовлетворительным, поскольку выбранная защита недостаточно устойчива в условиях этерификации.

Лучшие результаты дает взаимодействие α ,⁴³О-изопропилиден-ПН с полифосфорной кислотой (ПФК) [89, 90] либо с тетрахлорпирофосфатом в растворе триэтилфосфата при -20° [91]. В последнем случае авторам удалось получить весьма чистый ПНФ с выходом 90—95%.

2. Пиридоксамин-5'-фосфат. Различие в активности групп, способных этерифицироваться, в молекуле ПМ достаточно велико, поэтому фосфорилирование в мягких условиях или малоактивными агентами проходит преимущественно по 5-оксиметильной группе.

Все известные до настоящего времени методы связаны с непосредственной этерификацией дигидрохлорида ПМ и различаются лишь фосфорилирующими агентами и методами выделения ПМФ. Были использованы хлорокись фосфора в водном растворе [92], метафосфорная кислота [93] и ПФК [94].

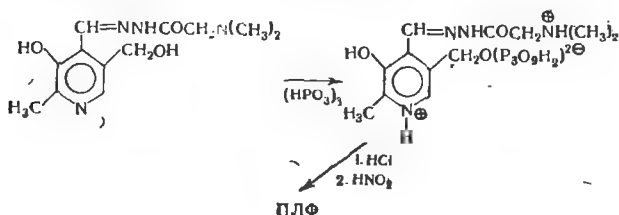
Перечисленные способы приводят к получению ПМФ, содержащего значительные количества примесей, причем выход не превышает 40%.

Проблема получения чистого ПМФ была разрешена Peterson, Sober [76, 95], которые применили для очистки сырого ПМФ, полученного фосфорилированием гидрохлорида ПМ с помощью ПФК, ионообменную хроматографию. Используя слабые катиониты в кислой форме, авторы получили весьма чистый ПМФ с выходом 70—75%. Дальнейшее развитие этот метод получил в работах [90, 96].

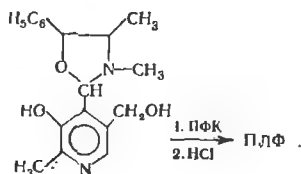
3. Пиридоксаль-5'-фосфат. Наибольшие затруднения вызывает прямое фосфорилирование ПЛ, поскольку последний существует преимущественно в форме внутреннего полуацетала, в котором блокирована именно 5'-оксигруппа. Так, при действии хлорокиси фосфора на ПЛ в водном растворе ПЛФ образуется лишь с незначительным выходом [97].

Поэтому основные усилия исследователей были направлены на поиски защитных группировок для 4-формильной группы ПЛ. В первой работе такого плана Viskontini и др. [98, 99] описали фосфорилирование N,N-диметилглицилгидразона ПЛ метафосфорной кислотой.

ПЛФ был получен этим методом с низким выходом, вероятно, вследствие жестких условий, в которых проводится гидролиз полифосфата и снятие защиты.



Были фосфорилированы ПФК оксазолидины, полученные при взаимодействии ПЛ с α -аминоспиртами, в частности с эфедрином [100]:



Автору удалось получить ПЛФ с выходом 43%.

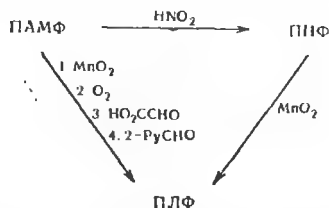
Дальнейшим развитием этого направления является фосфорилирование шиффовых оснований ПЛ с ароматическими [101—104] и алифатическими аминами [105]. В качестве фосфорилирующего агента использовали полифосфорную [101—103, 105] и метафосфорную кислоты [104]. Этот метод весьма удобен и позволяет получить ПЛФ с выходом 60—70%.

В последнее время появился ряд работ, посвященных этерификации при помощи полифосфорной и метафосфорной кислот гидразона и азина ПЛ. Полученный 5'-фосфорный эфир гидразона ПЛФ превращают в ПЛФ действием азотистой кислоты [105—110]. Этот метод не имеет преимуществ перед фосфорилированием шиффовых оснований.

Среди способов очистки следует отметить перекристаллизацию моноватриевой соли ПЛФ из водно-спиртового раствора [76] и хроматографию ПЛФ на силикате магния [111].

4. Взаимные превращения ПНФ, ПМФ и ПЛФ. Трудности, с которыми столкнулись исследователи при прямом

фосфорилировании ПЛ, заставили искать обходные пути синтеза ПЛФ. Были изучены взаимные переходы трех форм кофермента:



Действие азотистой кислоты на ПМФ даёт возможность получить ПНФ с выходом до 70% [76], хотя этот метод имеет лишь специальное значение, так как он уступает методам прямого фосфорилирования ПН через изопропилиновое производное.

Получение ПЛФ окислением ПНФ двуокисью марганца может оказаться полезным в специальных случаях, например при получении меченого ПЛФ [87].

До недавнего времени окисление ПМФ двуокисью марганца являлось основным способом синтеза ПЛФ. Тщательно разработанные методы выделения и очистки позволяли получить чистый ПЛФ с выходом до 40%.

Дальнейшим усовершенствованием этого пути является работа по окислению ПМФ кислородом воздуха в щелочной среде [112]. Авторы увеличили выход ПЛФ до 50—55%.

Новым этапом в разработке путей превращения ПМФ в ПЛФ явилось применение метода препаративного переаминирования.

Первая попытка такого рода относится к концу 50-х годов. Был получен ПЛФ при действии на ПМФ пировиноградной кислоты в присутствии солей двухвалентной меди [113]. Автору не удалось разработать оптимальные условия реакции, следствием чего явился низкий выход ПЛФ. В последние годы этот метод вновь привлек к себе внимание исследователей.

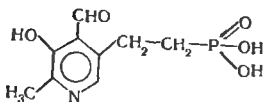
Kuroda Toshio тщательно изучил переаминирование ПМФ глиоксиловой кислотой в присутствии солей двухвалентной меди или никеля [90, 96, 114]. Результатом этого исследования явилось создание препаративного метода синтеза ПЛФ с выходами 70—72%. Другой метод основан на переаминировании ПМФ α-пиридинальдегидом [115] (выход ПЛФ 70%).

Из сказанного ясно, что препаративное переаминирование наряду с фосфорилированием шиффовых оснований является наилучшим из известных в настоящее время методов получения ПЛФ.

В основном именно эти 2 метода были использованы для получения ряда аналогов кофермента, которые представлены в табл. 16.

Т а б л и ц а 16

Аналоги пиридоксаль-5'-фосфата

Соединение	Метод получения	Литература
2-Нор-ПЛФ	Фосфорилирование шиффова основания	[66, 67, 118]
2-Нор-6-метил-ПЛФ	Переаминирование 2-нор-6-метил-ПМФ	[66, 118]
6-Метил-ПЛФ	Фосфорилирование шиффова основания	[66, 118]
2'-Метил-ПЛФ	Окисление двуокисью марганца 2-метил-ПМФ	[119]
2',2-Диметил-ПЛФ	Фосфорилирование шиффова основания	[67]
2'-н-Пропил-ПЛФ	Фосфорилирование шиффова основания	[66, 118]
5'-Метил-ПЛФ	То же	[66, 118]
2'-Окси-ПЛФ	» »	[66]
ПЛФ-N-окись	Действие As ₂ O на ПЛФ-N-окись	[120]
3-О-Метил-ПЛФ	Фосфорилирование шиффова основания	[121]
	То же	[122]
	Переаминирование 3-О-метил-ПМФ	[122]
		[123, 124]

В заключение нам хотелось бы упомянуть, что в литературе описано получение 5'-серных эфиров витамина В₆ [116, 117]. Можно полагать, что сопоставление методов синтеза фосфорных и серных эфиров будет полезным для понимания общих закономерностей этерификации витамина В₆ минеральными кислотами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Harris S., Stiller E., Folkers K. J.* Am. Chem. Soc., 1939, **61**, 1242.
2. *Harris S., Folkers K.* Science, 1939, **89**, 347.
3. *Kuhn R., Westphal K., Wendt G., Westphal O.* Naturwissenschaften, 1939, **27**, 469.
4. *Addinal C.* Merck Rept., 1939, **48**, 16.
5. *Балякина М. В., Преображенский Н. А., Жданович Е. С.* Витамин, АН УССР, Институт биохимии, 1958, **3**, 9.
6. *Cuiban F., Cilliaru St.* Rev. Chim. (Bucharest), 1959, **10**, 74.
7. «Pyridine and its derivatives». Interscience publishers. Part 1, 1962, p. 157, 367; Part 4, 1964, p. 18, 131.
8. В кн.: Vitaminy. Praha, 1961, 997.
9. *Fanelli A. II.* Farmaco (Pavia) Ed. Sci., 1962, **17**, 107.
10. *Svab A.* Tech. Publ. Stredisko. Tech. Inform. Potravinar Prumyslu, 1963, **139**, 80.
11. *Hsin Chiang Hsia, Yao Hsueh Hsueh Pao*, 1964, **11**, 285.
12. *Gyoergy P.* Vitamins Hormons, 1964, **22**, 361.
13. *Березовский В. М.* Химия витаминов. М., 1959, с. 379.
14. *Ванин А. Ф.* Успехи химии, 1971, **40**.
15. Франц. патент 1315280; С. А., 1963, **59**, 6369.
16. Японский патент 5834; С. А., 1965, **62**, 16205.
17. Японский патент 4074; С. А., 1965, **62**, 16211.
18. Чехосл. патент 117825; С. А., 1967, **66**, 2481.
19. *Harris S., Wilson A. J.* Am. Chem. Soc., 1941, **63**, 2526.
20. *Heyl D., Luz E., Harris S., Folkers K. J.* Am. Chem. Soc., 1953, **75**, 4079.
21. *Davoll H., Kipping F. J.* Chem. Soc., 1953, 1395.
22. *Cohen A., Silk J. A. J.* Chem. Soc., 1952, 4386.
23. *Reed L., Shive W. J.* Am. Chem. Soc., 1946, **68**, 2740.
24. *Gadekar S., Frederick I., De Renzo E. J.* Med. Pharm. Chem., 1962, **5**, 531.
25. *Jones R., Kornfeld E. J.* Am. Chem. Soc., 1951, **73**, 107.
26. Патент ФРГ 1134379; С. А., 1963, **58**, 1436.
27. Англ. патент 862581; С. А., 1962, **56**, 11574.
28. *Manoungou G.* Bull. Soc. etudes scient. «Anjou», 1967, **6**, 83.
29. *Кондратьева Г. Я.* Хим. наука и пром., 1957, **2**, 666.
30. *Кондратьева Г. Я.* Изв. АН СССР, ОХН, 1959, 484.
31. *Osbond J.* Vitamins Hormons, 1964, **22**, 366.
32. *Карпейский М. Я., Флорентьев В. Л.* Успехи химии, 1969, **38**, 1244.
33. *Хуан Чжи-Хэн, Кондратьева Г. Я.* Изв. АН СССР, ОХН, 1962, **525**.
34. *Yoshikawa T., Ishikawa F., Naito T.* Chem. Pharm. Bull., 1965, **13**, 878.
35. Японский патент 2705; С. А., 1967, **67**, 43684.
36. *Yoshikawa T., Ishikawa F., Omura Y., Naito T.* Chem. Pharm. Bull., 1965, **13**, 873.
37. Японский патент 19345, 1965; С. А., 1965, **63**, 16312.
38. Франц. патент 1343270; С. А., 1964, **60**, 11991.
39. *Firestone R., Harris E., Reuter W.* Tetrahedron, 1967, **23**, 943.
40. *Naito T., Yoshikawa T.* Chem. Pharm. Bull., 1966, **14**, 918.
41. Ам. патент 3227721; С. А., 1966, **64**, 8149.
42. *Кондратьева Г. Я., Хуан Чжи-Хэн.* ДАН СССР, 1961, **141**, 861.
43. *Harris E., Firestone R. et al. J. Org. Chem.*, 27, 2705 (1962).

44. Балякина М. В., Жукова З. Н., Ждинович Е. С. Журн. прикл. химии, 1968, 41, 2324.
45. Murakami M. et al. Ann. Meeting of Pharm. Soc. of Japan, oct. 23h, 1966.
46. Murakami M. et al. Bull. Chem. Soc. Japan., 1968, 41, 628.
47. Murakami M. et al. Bull. Chem. Soc. Japan., 1968, 41, 726.
48. Ам. патент 322724; С. А., 1966, 64, 8149.
49. Бельг. патент 617500; С. А., 1963, 59, 581.
50. Neth. Appl., 6410922; С. А., 1965, 63, 8366.
51. Ам. патент 3227721; С. А., 1966, 64, 8149.
52. Neth. Appl., 6614801; С. А., 1968, 68, 87190.
53. Neth. Appl., 6614802; С. А., 1968, 68, 87191.
54. Neth. Appl., 6506703; С. А., 1966, 64, 15851.
55. Франц. патент 1384099; С. А., 1965, 63, 4263.
56. Neth. Appl., 6404750; С. А., 1965, 62, 11818.
57. Neth. Appl., 6508673; С. А., 1966, 64, 14193.
58. Miki T., Matsuo T. The Kansai Branch Meeting of Pharm. Soc. of Japan, sept. 17h, 1966.
59. Miki T., Matsuo T. Yakugaku Zasshi, 1967, 87, 323.
60. Neth. Appl., 6607005; С. А. 1967, 67, 32593.
61. Neth. Appl., 6618133; С. А., 1967.
62. Naito T., Ueno K., Sano M., Omura Y., Itho I., Ishikawa F. Tetrahedron Letters, 1968, 5767.
63. Florentiev V. L., Drobinskaya N. A., Ionova L. V., Karpeisky M. Ya. Tetrahedron Letters, 1967, 1747.
64. Флорентьев В. Л., Дробинская Н. А., Ионова Л. В., Карпейский М. Я., Турчин К. Ф. ДАН СССР, 1967, 177, 617.
65. Дробинская Н. А., Ионова Л. В., Карпейский М. Я., Флорентьев В. Л. ХГС, 1969, 1028.
66. Doktorova N. A., Ionova L. V., Karpeisky M. Ya., Padyukova N. Sh., Turchin K. F., Florentiev V. L. Tetrahedron, 1969, 25, 3527.
67. Mühlradt P., Morino Y., Snell E. J. Med. Chem., 1967, 10, 341.
68. Бельг. патент 617499; С. А., 1963, 59, 634.
69. Кондратьева Г. Я., Хуан Чжи-Хэн. ЖОХ, 1962, 32, 2348.
70. Harris S., Heyl D., Folkers K. J. Am. Chem. Soc., 1944, 66, 2088.
71. Бельг. патент 648226; С. А., 1966, 64, 8149.
72. Японский патент 11745, 1967; С. А., 1968, 68, 87176.
73. Англ. патент 852398; С. А., 1961, 55, 10477.
74. Ayling J., Snell E. Biochemistry, 1968, 7, 1626.
75. Viskontini M., Ebnother C., Karrer P. Helv. Chim. Acta, 1951, 34, 1834.
76. Peterson E., Sober H. J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 169.
77. Mancera O., Rosenkranz G., Sondheimer F. J. Chem. Soc., 1953, 2189.
78. Harnfest M., Bavelly A., Lazier W. J. Org. Chem., 1954, 19, 1608.
79. Балякина В. М. Синтетические исследования в области витаминов группы В₆. Дисс. канд. М., 1962.
80. Японский патент 26820, 1965; С. А., 1966, 64, 8154.
81. Японский патент 26728, 1964.
82. Докторова Н. А., Карпейский М. Я., Падюкова Н. Ш., Турчин К. Ф., Флорентьев В. Л. ХГС, 1971, 3, 365.
83. Ahrens H., Korytnyk W. J. Heter. Chem., 1967, 4, 625.
84. Paradopoulos E., Jarrar A., Issidorides C. J. Org. Chem., 1966, 31, 615.
85. Beiler J., Martin G. J. Biol. Chem., 1947, 169, 349.

86. *Heyl D., Luz E., Harris S., Folkers K. J.* Am. Chem. Soc., 1951, **73**, 3430.
87. *Baddiley J., Mathias A. J.* Chem. Soc., 1952, 2583.
88. *Stock A., Ortanderl F., Peleiderer G.* Biochem. Z., 1966, **344**, 353.
89. Японский патент 10155, 1965.
90. *Kuroda Toshio.* J. Vitaminol., 1964, **10**, 252.
91. *Neth. Appl.*, 6514131.
92. *Heyl D., Luz E., Harris S., Folkers K. J.* Am. Chem. Soc., 1951, **73**, 3436.
93. *Viskontini M., Ebnother C., Karrer P.* Helv. Chim. Acta, 1951, **34**, 2199.
94. *Wilson A., Harris S. J.* Am. Chem. Soc., 1951, **73**, 4639.
95. *Peterson E., Sober H., Mister A. J.* Am. Chem. Soc., 1952, **74**, 570.
96. *Toshio Kuroda.* Bitamin (Kyoto), 1963, **28**, 211.
97. *Gunsalus I., Umbreit W., Bellamy W., Foust C. J.* Biol. Chem., 1954, **161**, 743.
98. *Viskontini M., Ebnother C., Karrer P.* Helv. Chim. Acta, 1951, **34**, 1834.
99. *Viskontini M., Karrer P.* Helv. Chim. Acta, 1952, **35**, 1924.
100. Ам. патент 3124587; C. A., 1964, **61**, 3978.
101. Японский патент 18749, 1965; C. A., 1966, **64**, 2069.
102. Японский патент 21786, 1965; C. A., 1966, **64**, 2067.
103. Японский патент 25340, 1965; C. A., 1966, **64**, 11181.
104. Японский патент 3305, 1965; C. A., 1967, **67**, 82109.
105. Японский патент 6907, 1966; C. A., 1966, **65**, 7151.
106. *Okumura K., Oda T., Nishihara T.* Bitamin, 1967, **35**, 380.
107. *Okumura K., Oda T., Nishihara T.* Bitamin, 1967, **35**, 384.
108. Франц. патент 1477940; C. A., 1968, **68**, 29610.
109. Англ. патент 1076910; C. A., 1968, **68**, 59443.
110. Франц. патент 1473663; C. A., 1968, **68**, 87195.
111. Японский патент 20864, 1965.
112. Японский патент 20715, 1965.
113. Англ. патент 749800; C. A., 1957, **51**, 1279.
114. Японский патент 19739, 1963.
115. Японский патент 5095, 1966; C. A., 1966, **65**, 2230.
116. Японский патент 5034, 1963; C. A., 1964, **61**, 1997.
117. *Toshio Kuroda.* Bitamin, 1963, **28**, 21.
118. *Дробинская Н. А., Ионова Л. В., Карпейский М. Я., Флорентьев В. Л.* ХГС, 1969, 1037.
119. *Ikawa M., Snell E. J.* Am. Chem. Soc., 1954, **76**, 637.
120. *Nakai Y., Masugi F., Ohishi N., Fukui S.* Vitamins (Japan), 1968, **38**, 189.
121. *Nakai Y., Ohishi N., Shimizu S., Fukui S.* Vitamins (Japan), 1967, **36**, 521.
122. *Stambolieva N. A., Breusov Iu. N., Karpeisky M. Ya, Kritzin A. M., Florentiev V. L.* Tetrahedron, 1971, **26**, 3083.
123. *Hullar T.* Tetrahedron Letters, 1967, 4921.
124. *Hullar T. J.* Med. Chem., 1969, **12**, 58.

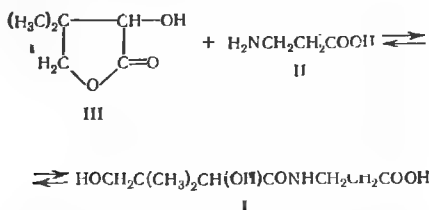
КОФЕРМЕНТ АЦИЛИРОВАНИЯ (КОФЕРМЕНТ А) МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ И ПУТИ ХИМИЧЕСКОГО СИНТЕЗА

В. М. КОПЕЛЕВИЧ, | Е. С. ЖДАНОВИЧ |

Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва

В 1932 г. Williams и др. [1] сообщили об открытии нового витамина, который они называли пантотеновой кислотой (I). Строение пантотеновой кислоты было установлено после изучения ее щелочного гидролиза, который приводил к образованию β-аланина (II) и α-окиси-β,β-диметил-γ-бутиролактона, пантолактона (III).

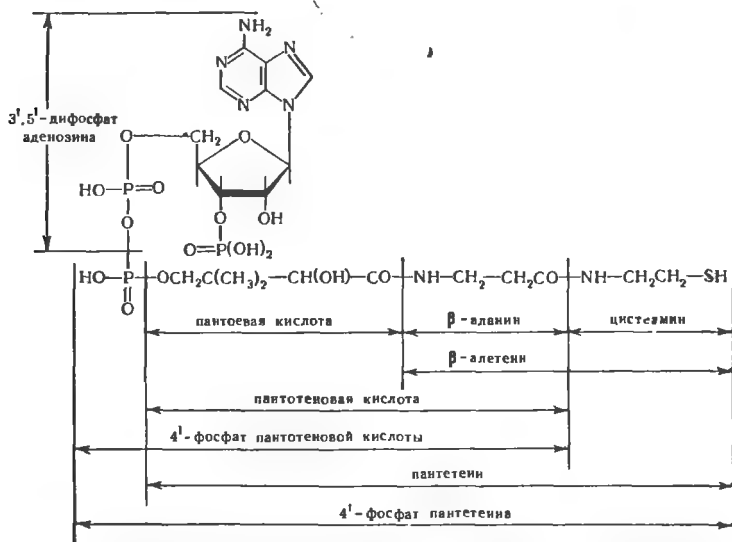
Конденсацией этих веществ удалось осуществить ресинтез пантотеновой кислоты.



Пантотеновая кислота, имеющая также наименование витамина В₃, является необходимым фактором нормального физиологического развития организма. Она чрезвычайно широко распространена в природе и содержится во многих пищевых продуктах животного и растительного происхождения; кроме того, содержащаяся в кишечнике палочка *E. coli* вырабатывает пантотеновую кислоту в большом количестве. Таким образом, потребность организма в витамине В₃ почти полностью удовлетворяется и самопроизвольного авитаминоза пантотеновой кислоты у человека не наблюдается. В связи с этим долгое время оставалась неясной роль пантотеновой кислоты для живого организма. В 1947 г. Лупен показал, что пантотеновая кислота входит в состав кофермента ацилирования (КоА), занимающего центральное место в метаболических процессах. В последние годы было обнаружено, что пантотеновая кислота является также составной частью так называемого белкового переносчика ацильных групп, который функционирует в целом ряде биосинтетических процессов. Наличие пантотеновой кислоты в составе двух коферментов, участвующих в важнейших ферментативных реакциях, и определяет ее биологическое значение.

Биологическая роль и механизм действия кофермента А

В 1945 г. Липманн был открыт кофактор, необходимый для ферментативного ацетилирования ароматических аминов [2]. В следующем году было установлено, что этот же кофактор требуется для ацетилирования холина в ацетилхолин [3]. Дальнейшие исследования показали, что это соединение широко распространено в природе и принимает участие во многих процессах биологического ацилирования, являясь активатором и переносчиком ацильных групп, в связи с чем оно и было названо коферментом ацетилирования (ацилирования) или коферментом А (КоА). Строение КоА было установлено к 1952 г. с помощью ферментативного и кислотного гидролиза [4]. Он был определен как 3'-фосфоаденозил-(5'-4)-дифосфопантоил-N-β-аланил-2-меркаптоэтиламин (IV). Ниже показана структура кофермента А.



Биологическая роль кофермента А связана с важными реакциями, протекающими в животных и растительных тканях — реакциями трансаацилирования. К настоящему времени известно около 70 ферментативных реакций с участием кофермента А в метаболизме углеводов, белков и липидов, а также в процессах тканевого дыхания, брожения, водного

обмена и т. д. При участии КоА происходит активирование промежуточных продуктов дыхательного цикла и окисления жирных кислот. Он является важнейшим кофактором ряда стадий синтеза жирных кислот, сложных липидов, стероидов, изопrenoидных соединений. КоА через стадию переноса сукцинильного остатка включается в синтез порфиринов, что связывает его с процессами кроветворения. Большое значение в передаче нервных импульсов имеет реакция образования ацетилхолина, также протекающая с участием кофермента А [5].

Во всех перечисленных реакциях функционально активной группировкой КоА, которая подвергается попеременно-му ацилированию с образованием ацил-КоА и деацилированию с освобождением КоА, является концевая тиоловая группа. В соответствии с этим все реакции с участием КоА можно разделить на две общие группы:

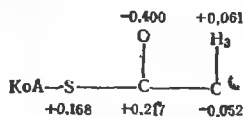
1. Ацилдонорные реакции, в которых происходит образование ацилпроизводных КоА;

2. Ацилакцепторные реакции, в которых ацильные группы переносятся на другие соединения.

Процесс образования ацил-КоА, катализируемый ацил-КоА-синтетазой, связан с затратой энергии, источником которой служит энергия аденозинтрифосфата (АТФ):

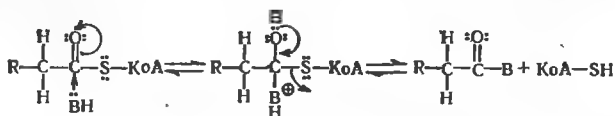


В образовавшейся ацилтиоэфирной связи S-ацил-КоА заключен большой запас свободной энергии гидролиза (для ацетил-КоА $\Delta F = 8,2$ ккал/моль), который используется затем в организме для осуществления биосинтетических реакций. Для тиоэфиров КоА характерным является наличие суммарного положительного заряда на углеродном атоме карбонильной группы и суммарного отрицательного заряда на атоме углерода алкильной группы [6].



Такое распределение электронной плотности в ацилпроизводных КоА определяет наличие у них 2 центров (нуклеофильного и электрофильного) и, следовательно, возможность протекания 2 основных типов реакций с участием ацил-КоА:

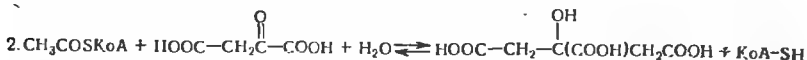
1. Реакции ацилирования, осуществляемые по механизму нуклеофильного замещения. Перенос ацильной группы включает в себя замещение ацильной группы на какой-либо нуклеофил В.



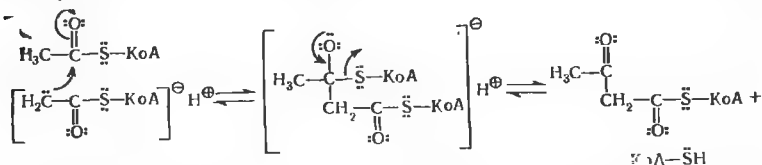
Распространенность такого типа реакций иллюстрирует табл. 17.

2. Реакции конденсации, осуществляемые по механизму электрофильного замещения, в которых участвует активированный α -углеродный атом.

Активация α -углеродного атома дает возможность тиоловым эфирам КоА участвовать в реакциях в качестве нуклеофила и объясняет многие важные реакции, происходящие с участием ацилпроизводных кофермента А. Примерами таких реакций являются карбоксилирование пропионил-КоА с образованием метилмалонил-КоА (реакция 1) и образование лимонной кислоты при связывании α -углеродного атома ацетильной группы КоА и карбонильного углерода щавелевоуксусной кислоты (реакция 2).



В реакции конденсации двух молекул ацетил-КоА с образованием ацетоацетил-КоА принимают участие оба активных центра — положительно заряженный атом углерода карбонила и отрицательно заряженный атом углерода метильной группы. В этом случае ацетил-КоА действует и как электрофил (реакция 1), и как нуклеофил (реакция 2).



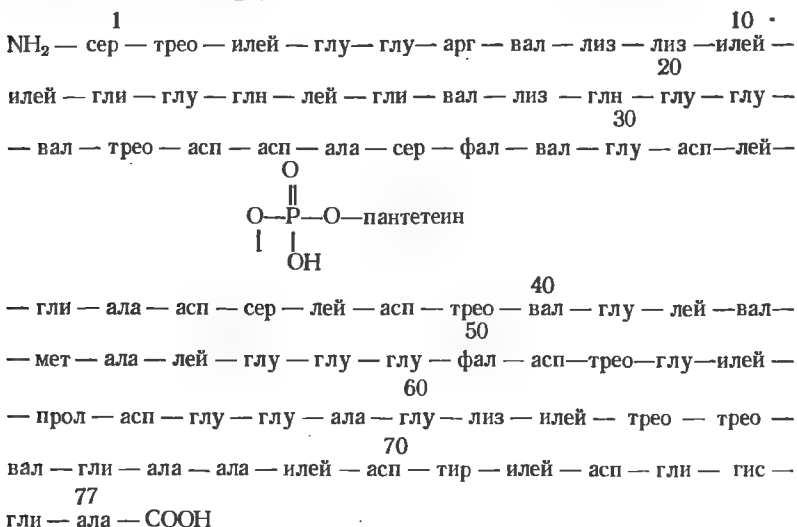
Следует отметить, что, хотя КоА чрезвычайно широко участвует в обмене веществ, изучению механизма КоА-зависимых реакций уделялось значительно меньшее внимание

Реакции ацил-КоА с замещением КоА

Нуклеофил	Реакция	Фермент (травильное название)
Амин	Ацетил-КоА + ариламин $\rightarrow$ N-ацетилариламин + КоА	Ариламинацетилтрансфераза
Спирт	Ацетил-КоА + холин $\rightleftharpoons$ O-ацетилхолин + КоА	Холинацетилтрансфераза
Имин	Ацетил-КоА + имидазол $\rightleftharpoons$ N-ацетилимидазол + КоА	Имидазолацетилтрансфераза
Фосфат	Ацетил-КоА + ортофосфат $\rightleftharpoons$ ацетилфосфат + КоА	Фосфатацетилтрансфераза
Гидрид-ион	Ацетил-КоА + НАДН $\rightarrow$ альдегид + КоА + НАД	Альдегиддегидрогеназа
Меркаптан	Ацетил-КоА + дигидролипоат $\rightleftharpoons$ КоА + 6-S-ацетилдигидролипоат	Липоатацетилтрансфераза
Гидроксид-ион	Пальмитоил-КоА + H ₂ O $\rightarrow$ пальмитиновая кислота + КоА	Пальмитоил-КоА-гидролаза
Цианид	Ацетил-КоА + HCN $\rightleftharpoons$ ацетил-CN + КоА	

по сравнению с другими коферментами, такими, как НАД, ФАД, пиридоксаль-5'-фосфат. До сих пор, например, не выяснена роль остатка пантотеновой кислоты и нуклеозидного компонента в механизме ферментативных реакций, происходящих с участием КоА.

Исследованиями последних лет было показано, что в целом ряде биосинтетических реакций в качестве переносчика ацильных групп принимает участие термостабильный белок, который по биологическим функциям близок КоА [7]. Изучение первичной структуры (аминокислотной последовательности) этого соединения, названного белковым переносчиком ацильных групп (БПАГ), вели независимо 2 группы ученых [8]. Было установлено, что БПАГ является теплоустойчивым белком с молекулярным весом 8847, простетической группой и субстратсвязывающим участком которого является 4'-фосфат пантетеина, т. е. ненуклеотидный компонент КоА. Дальнейшие исследования показали, что 4'-фосфат пантетеина в БПАГ связан с апоферментом фосфодиэфирной связью через гидроксильную группу остатка серина. В конце 1968 г. была опубликована работа, в которой приводится полная аминокислотная последовательность БПАГ из *E. coli* [9].



Изучение структуры и функций белкового переносчика ацильных групп интенсивно ведется и в настоящее время [10].

Пути химического синтеза кофермента А

Хотя строение кофермента А было установлено в 1952 г., его полный синтез был осуществлен лишь в 1959 г. В последующие годы было описано несколько методов получения КоА, которые основаны на конденсации 4'-фосфата пантетеина (и его производных) с фосфатами аденозина, но отличаются друг от друга по способам образования пиррофосфатного моста между 2 основными компонентами и введения фосфомоноэфирной группы в положении 3'-аденозиновой части. Осуществлению полного синтеза кофермента А предшествовало получение следующих основных компонентов его молекулы — *D*-(+)-пантотеновой кислоты; *D*-(+)-пантетеина и его 4'-фосфата; аденозин-3',5'-дифосфата.

1. Синтез *D*-(+)-пантотеновой кислоты (витамин В₃). Все пути синтеза пантотеновой кислоты (I) сводятся в основном к конденсации β-аланина (II) и его солей с пантолактоном (III). В молекуле пантотеновой кислоты (I) имеется α-асимметрический атом углерода, в связи с чем она может существовать в 2 энантиомерных формах. Природной биологически активной формой является правоповорачивающий изомер, которому на основании эмпирического правила Хадсона приписана *D*-(+)-конфигурация [11]. Лишь в 1970 г. превращением (—)-пантолактона в этиловый эфир (+)-пинаколина было доказано, что пантотеновая кислота имеет *D*-конфигурацию (или в системе Кана — Ингольда — Прелога — *R*-конфигурацию) [12]. Для получения природной *D*-формы синтетическую пантотеновую кислоту расщепляют на энантиометры или синтезируют ее из оптически активного *D*-(—)-пантолактона. Рацемический пантолактон предварительно превращают в соответствующую кислоту, и расщепление на оптические антиподы проводят дробной кристаллизацией ее солей с алкалоидами [13—15], а также с оптически деятельными синтетическими аминами, такими, как α-фенилэтиламин [16] и *L*-(+)-трео-1-(*n*-нитрофенил)-2-амино-1,3-пропандиол [*L*-(+)-треоамин] [17, 18]. Промышленный метод получения оптически активной *D*-(+)-пантотеновой кислоты разработан во Всесоюзном научно-исследовательском витаминном институте [19].

2. Синтез производных *D*-(+)-пантетеина и их 4'-фосфатов. В 1947 г. из дрожжевых экстрактов *Lactobacillus bulgaricus* был выделен ростовой фактор, который оказался

значительно эффективнее *D*-(+)-пантотеновой кислоты [20]. Этот фактор, названный *D*-(+)-пантетеином (V), является производным *D*-(+)-пантотеновой кислоты (I) и цистеамина (2-меркаптоэтиламина) (VI).

Многочисленные пути синтеза *D*-(+)-пантетеина (V) и его производных, разработанные в последующие годы, можно разделить на две общие группы. Первая включает в себя реакцию цистеамина (VI) и его S-производных с функциональными производными *D*-(+)-пантотеновой кислоты (I), такими, как эфиры, азиды и смешанные ангидриды, а вторая — конденсацию *D*-(—)-пантолактона (III) с N-β-аланилцистеамином (β-алетеином) (VII) и его S-производными. Snell и др. [21] впервые получили *D*-(+)-пантетин (V) конденсацией метилового эфира *D*-(+)-пантотеновой кислоты (VIII) и цистеамина (VI). Позднее этот метод был более подробно разработан Wittle [22] (схема I на стр. 246).

Нами был осуществлен синтез *D*-(+)-пантетина (IX) конденсацией смешанного ангидрида пантотеновой кислоты и этилового эфира хлоругольной кислоты (X), полученного из доступной кальциевой соли *D*-(+)-пантотеновой кислоты, и цистамина (XI) [23] (схема I).

В 1965 г. группа Shimizu описала одностадийный путь получения *D*-(+)-пантетеина (IX) конденсацией *D*-(+)-пантотеновой кислоты (I) с цистамином (XI) в присутствии N, N'-дициклогексилкарбодиимида [24]. Этот способ может быть достаточно эффективным для синтеза меченого *D*-(+)-пантетина (схема I).

Ряд S-ацильных производных *D*-(+)-пантетеина, которые были использованы в качестве модельных веществ для изучения процессов биологического ацилирования вне организма [25], были получены конденсацией смешанного ангидрида (X) с S-ацилцистеамином [26]. Большой интерес представляет синтез (+)-S-бензоил- и (+)-S-ацетилпантетеина (XII, XIII), в котором смешанный ангидрид (X) реагирует с этиленимином, образуя пантотенилэтиленимин (XIV); раскрытие этилениминного кольца при действии тиобензойной или тиоуксусной кислот приводит к соединению (XII) или (XIII) [27] (схема I).

Другой путь синтеза производных пантетеина заключается в конденсации пантолактона (III) с производными β-алетеина (VII), в результате чего происходит раскрытие лактонного цикла и образование амидной связи. Такая конденсация, предложенная в работах [28, 22], протекает как

при кипячении в спиртовом растворе, так и в отсутствие растворителя при 100° (схема 1).

Аналогичным путем синтезированы *D*-(+)-пантетин (IX) [29, 30] и *S*-бензилпантетеин [31].

Пути синтеза *D*-(+)-пантетеина и его производных

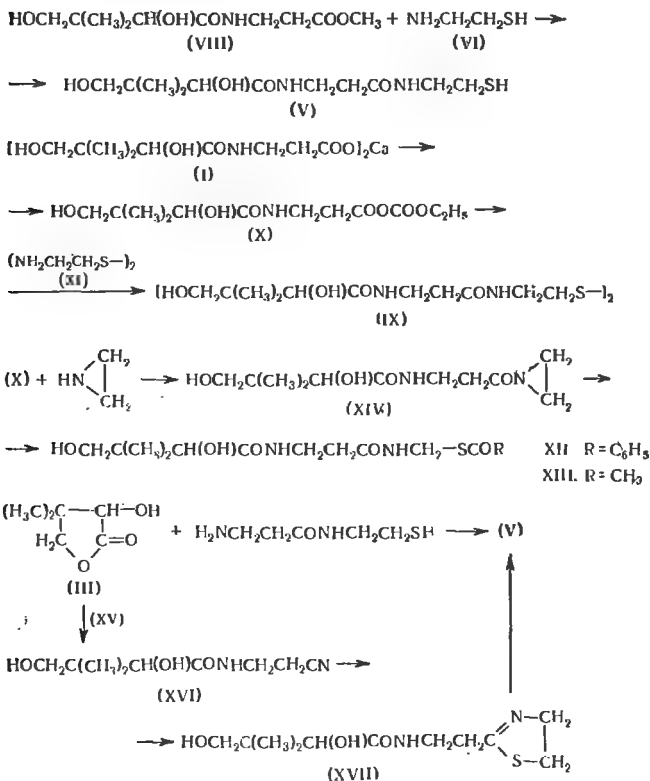


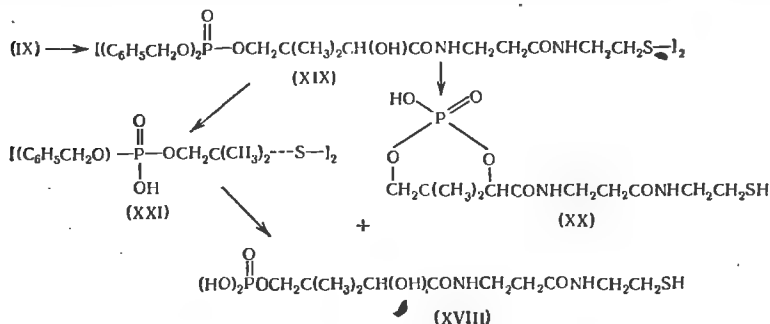
Схема 1

Особенностью «тиазолинового» метода получения пантетина, разработанного группой Shimizu, является использование в качестве исходного соединения β-аминопропионитрила (XV) вместо β-аланина [24]. На первой стадии синтеза *D*-(—)-пантолактон (III) конденсирует с β-аминопропионитрилом (XV) и полученный (+)-пантотенонитрил (XVI) обрабатывают в спиртовом растворе цистеамином (VI), в результате чего образуется 2-(2-*D*-пантамидозил)-

2-тиазолин (XVII) почти с количественным выходом. Гидролиз тиазолина (XVII) уксусной или щавелевой кислотами в интервале pH 3,5—5,3 приводит к *D*-(+)-пантетеину (V) (схема 1).

Важнейшим промежуточным соединением в биосинтезе и химическом синтезе кофермента А является 4'-фосфат *D*-(+)-пантетеина (XVIII), который первоначально был выделен в результате кислотного и ферментативного гидролиза КоА [4].

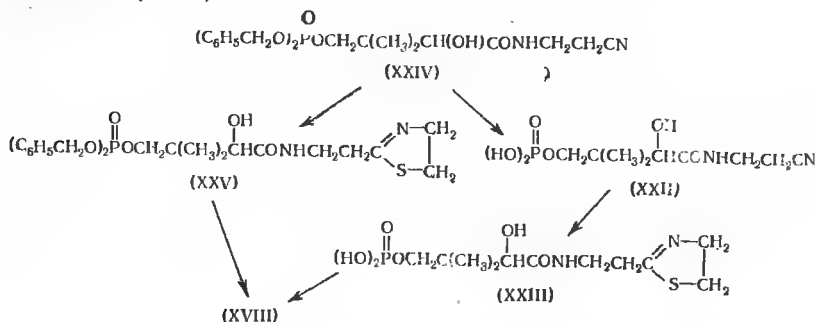
Химический синтез соединения (XVIII), осуществленный впервые в работе [32], состоит в прямом фосфорилировании *D*-(+)-пантетина (IX) дибензилхлорфосфатом с образованием нейтрального дибензильного эфира (XIX), последующем удалении бензильных групп и восстановлении дисульфидной связи натрием в жидком аммиаке.



Позднее было показано [33], что побочным продуктом этой реакции был циклический фосфат пантетеина (XX), который получался при обработке соединения (XIX) натрием в жидком аммиаке в результате внутримолекулярной переэтерификации. Для снижения скорости конкурентной реакции триэфир (XIX) сначала превращали в диэфир (XXI) обработкой 50% уксусной кислотой, а затем восстанавливали натрием в жидком аммиаке. Такая модификация позволила увеличить выход 4'-фосфата *D*-(+)-пантетеина (XVIII) с 22 до 40—44%. Михельсон применил этот путь для синтеза 4'-фосфата *D*-(+)-пантетеина. Выделение конечного продукта в дисульфидной форме также привело к значительному увеличению выхода [34]. Однако необходимо отметить, что приведенный метод имеет ряд серьезных недостатков, обусловленных применением неустойчивого

дибензилхлорфосфата и использованием для дибензилирования натрия в жидком аммиаке.

Nagase [35], используя «тиазолиновый метод», получил 4'-фосфат *D*-(+)-пантетеина (XVIII) из 4'-фосфата *D*-(±)-пантотенонитрила (XXII) через промежуточное тиазолиновое производное (XXI), а также из 4'-дибензилфосфата *D*-(+)-пантотенонитрила (XXIV) через тиазолиновое соединение (XXV).



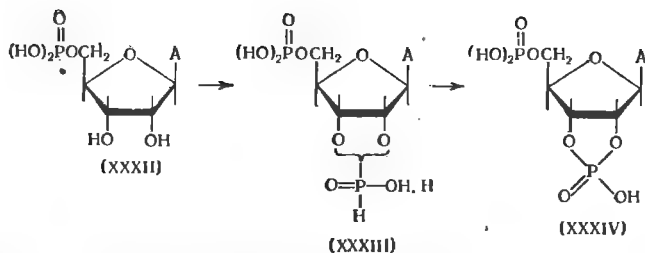
Нами был предложен новый метод фосфорилирования *D*-(+)-пантетеина (V) и *S*-бензоилпантетеина (XII) с использованием производных морфолидофосфорной кислоты. При взаимодействии *S*-бензоилпантетеина (XII) с морфолидофосфодихлоридом был получен 4'-фосфат (+)-*S*-бензоилпантетеина (XXVI) с выходом более 70%, причем в отличие от других методов конечный продукт выделяют в форме свободной кислоты, которая может быть использована в синтезе КоА без дополнительной обработки [36].

Для получения 4'-фосфата *D*-(+)-пантетеина (XXVII) были использованы морфолидофосфодихлорид и P^1 -дифенил- P^2 -морфолидопирофосфохлорид [37].

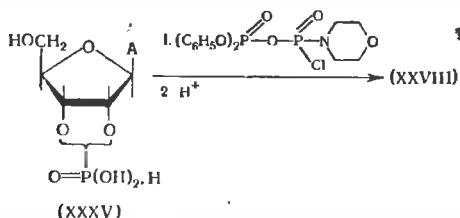
Недавно для получения 4'-фосфата пантотеновой кислоты и ее производных был применен β-цианэтилфосфат, однако выход конечных продуктов был невысоким и составлял 35—40% [38].

3. Синтез аденозин-3',5'-дифосфата. Одной из главных проблем в синтезе кофермента А является получение аденозин-3',5'-дифосфата.

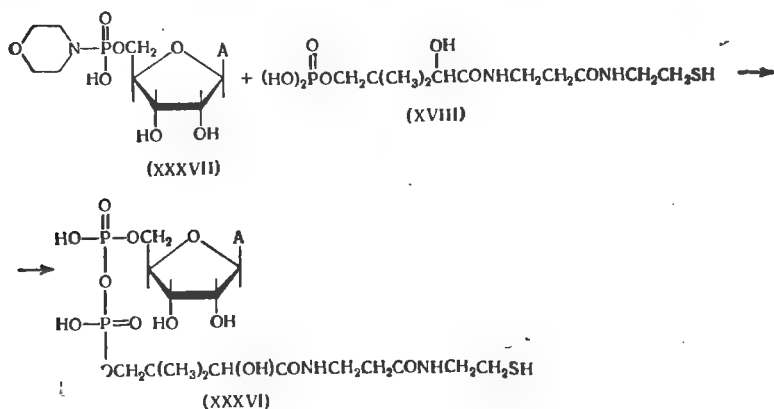
Для получения смеси аденозин-2',5'- и аденозин-3',5'-дифосфатов (XXVIII) было использовано прямое фосфорилирование аденозина (XXIX) избытком дибензилхлорфосфата [39] и 2-цианэтилфосфатом в присутствии дициклогексилкарбодиимиды [40].



Удобным методом получения аденозин-2' (3'), 5'-дифосфатов является фосфорилирование доступного аденозин-2' (3')-монофосфата (XXXV) P¹-дифенил-P²-морфолидопирофосфохлоридом [43]. К достоинству этого метода следует отнести возможность непосредственного получения 5'-фосфоморфолида в реакции фосфорилирования.



4. Синтез кофермента А. Заключительной стадией в получении кофермента А является построение пирофосфатной связи между его нуклеотидной и ненуклеотидной компонентами.



Полный синтез кофермента А (IV) и дефосфокофермента А (XXXIV) был впервые осуществлен на основе фосфоамидатного метода синтеза пирофосфатной связи [33]. Реакция между аденозин-5'-фосфоморфолидом (XXXVII) и 4'-фосфатом *DL*-пантетеина (XVIII) приводила к 3'-дефосфокоферменту А (XXXVI).

Конденсация аденозин-(2',3'-циклофосфо)-5'-фосфоморфолида (XXXVIII) с 4'-фосфатом *D*-(+)-пантетеина (XVIII) давала соединение (XXXIX), которое при обработке разбавленной соляной кислотой для раскрытия кольца 2',3'-циклофосфата превращается в кофермент А и изокофермент А (2'-фосфат). Эти вещества разделяли хроматографированием на ЭКТЕОЛА-целлюлозе и получали КоА с выходом ~30%. Синтетический КоА по химическим и коферментным свойствам оказался идентичным веществу, выделенному из природных источников (схема 2).

Michelson использовал для синтеза КоА антидридный метод. При обработке аденозин-2' (3'), 5'-дифосфата (XXVIII) дифенилхлорфосфатом с количественным выходом образуется P¹-аденозин-(2',3'-циклофосфо)-5'-P²-дифенилпирофосфат (XL), взаимодействие которого с 4'-фосфатом *D*-(+)-пантетеина (XVIII) дает соединение (XLI). Кислотный гидролиз такого циклофосфата, примененный Moffat, Khogana [33], неизбежно приводит к смеси 2'- и 3'-фосфатов и в связи с этим к трудоемкому разделению изомеров КоА. Michelson [34] применил для расщепления циклофосфата (XLI) рибонуклеазу T2, что дает исключительно 3'-фосфат. После восстановления β-меркаптоэтанолом и хроматографической очистки был получен кофермент А с выходом 63% (схема 2).

Японские авторы использовали для получения кофермента А комбинацию морфолидатного метода Khogana для построения пирофосфатной связи и метода расщепления 2',3'-циклофосфата с помощью рибонуклеазы в применении к их тиазолиновому методу [44]. Ключевое промежуточное соединение P¹-аденозил-3'-фосфат-5-P²-*D*-пантотенонитрил-4'-пирофосфат (XLII) синтезировали реакцией 4-фосфата-*D*-(+)-пантотенотрила (XXII) с аденозин-(2',3'-циклофосфо)-5'-фосфоморфолидом (XXXVIII) и затем обрабатывали рибонуклеазой T2. Кипячение соединения (XLII) с 5 эквивалентами цистеаминна (VI) приводит к промежуточному тиазолиновому производному (XLIII), которое при кислотном гидролизе переходило в КоА. Продукт очищали хро-

матографией на ДЭАЭ-целлюлозе и получали вещество высокой степени чистоты с выходом 29,7% (схема 2).

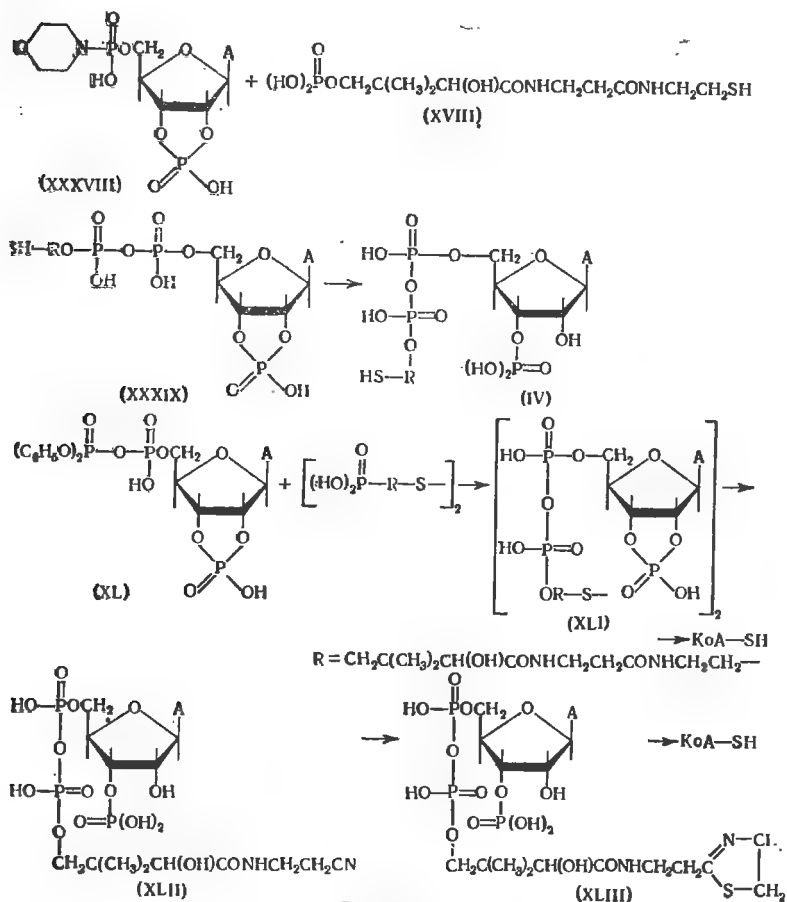
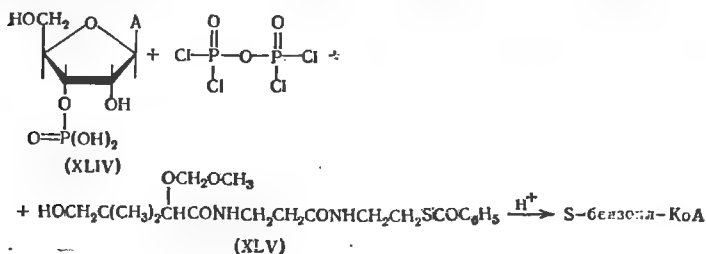


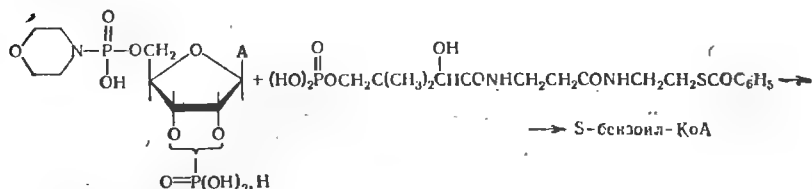
Схема 2
Пути синтеза кофермента А

По методу [45] была сделана попытка построения пирофосфатной группы в KoA как единого целого, используя для этого пирофосфорилирующий агент—тетрахлорид пирофосфорной кислоты. Исходными веществами в этом синтезе были аденозин-3'-фосфат (XLIV) и S-бензоил-2'-О-метоксиметилпантетеин (XLV). После отщепления метоксиметиль-

ной группы S-бензоилкофермент А выделяют с помощью препаративного электрофореза. Однако выход конечного продукта был очень низким и составлял лишь 0,2—0,9%.



Нами S-бензоилкофермент А был синтезирован конденсацией аденозин-2'(3')-фосфат-5'-фосфоморфолида (XLVI), полученного непосредственным фосфорилированием аденозин-2'(3')-монофосфата (XXXV) P¹-дифенил-P²-морфолидипирофосфохлоридом, с 4'-фосфатом (+)-S-бензоилпантотеина (XXVI) [46].



В последние годы осуществлен синтез ряда аналогов кофермента А, модифицированных в пуриновой, пантоевой и цистеаминовой частях молекулы с целью получения дальнейшей информации о роли отдельных фрагментов КоА во взаимодействии между КоА и ферментными системами [47, 48]. В частности, было показано, что молекула аденозина имеет решающее значение в связывании КоА с активным центром фосфотрансацетилазы [49].

ЛИТЕРАТУРА

1. Williams R., Lyman C., Goodyear G., Truesdall J. J. Am. Chem. Soc., 1932, 54, 3462.
2. Lipmann F. J. Biol. Chem., 1945, 160, 173.
3. Nachmanson D., Berman M. J. Biol. Chem., 1946, 165, 551.
4. Baddiley J., Thain E. J. Chem. Soc., 1951, 2253.

5. *Jaenicke L., Lynen F.* The Enzymes. V. 3. Academic Press. New York, 1960, 5.
6. *Пюльман Б., Пюльман А.* Квантовая биохимия. М., 1965, 304.
7. *Majerus P., Vagelos P.* Federation Proc., 1964, 23, 166.
8. *Wakil S., Pugh E., Sauer F.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1964, 53, 106;
Majerus P., Alberts A., Vagelos P. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1964, 53, 410.
9. *Wanaman T., Wakil S., Hill R. J.* Biol. Chem., 1968, 243, 6422.
10. *Matsumura S.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 1970, 38, 238; *Butterworth P.* Eur. J. Biochem., 1970, 12, 497.
11. *Grussner A., Gatzu-Fichter M., Reichstein T.* Helv. Chim. Acta, 1940, 23, 1276.
12. *Hill R., Chan T.* Biochim. Biophys. Res. Commun., 1970, 38, 181.
13. *Major R., Finkelstein J. J.* Am. Chem. Soc., 1941, 63, 1368.
14. *Bentel R., Tishler M. J.* Am. Chem. Soc., 1946, 68, 1463.
15. Чехосл. патент 88066, 1958; С. А., 1960, 59, 15250.
16. *Ozerkowski W., Haering H.* Pharmazie, 1957, 12, 254.
17. *Жданович Е. С., Крылова В. Н., Козлова Г. С., Преображенский Н. А., ЖОрХ*, 1967, 3, 826.
18. *Жданович Е. С., Козлова Г. С., Мариева Т. Д., Мельникова Т. В., Преображенский Н. А.* ЖОрХ, 1968, 4, 1359.
19. *Жданович Е. С., Козлова Г. С., Мариева Т. Д., Мельникова Т. В., Преображенский Н. А.* ЖОрХ, 1968, 4, 1361.
20. *Williams R., Hoff-Jorgensen E. J.* Biol. Chem., 1949, 177, 833.
21. *Snell E., Brown G., Peters V., Craig J., Wittle E., Moore J., McGlothlon V., Bird D. J.* Am. Chem. Soc., 1950, 72, 5349.
22. *Wittle E., Moore J. J.* Am. Chem. Soc., 1953, 75, 1694.
23. *Жданович Е. С., Копелевич В. М., Преображенский Н. А.* ЖОХ, 1967, 37, 361.
24. *Shimizu M., Ohta G., Nagase O., Okada S., Hosakawa Y.* Chem. and Pharm. Bull., 1965, 13, 180.
25. *Schwyzer R.* Helv. Chim. Acta, 1953, 36, 414.
26. *Felder E., Pitre D.* Gazz. Chim. Ital., 1958, 88, 401.
27. *Schwyzer R.* Helv. Chim. Acta, 1952, 35, 1903.
28. *Baddiley I., Thain E. J.* Chem. Soc., 1952, 800.
29. *Viscontini M., Advank K., Merckling N., Erhardt K., Karrer P.* Helv. Chim. Acta, 1953, 36, 835.
30. *Bowmann R., Cavalla J. J.* Chem. Soc., 1954, 1171.
31. *Walton E., Willson N., Holly P., Folkers K. J.* Am. Chem. Soc., 1954, 76, 1146.
32. *Baddiley I., Thain E. J.* Chem. Soc., 1953, 1610.
33. *Moffat J., Khorana H. J.* Am. Chem. Soc., 1961, 83, 663.
34. *Michelson A.* Biochim. Biophys. Acta, 1964, 93, 71.
35. *Nagase O.* Chem. Pharm. Bull., 1967, 15, 648.
36. *Копелевич В. М., Жданович Е. С., Преображенский Н. А.* ЖОХ, 1968, 38, 1700.
37. *Копелевич В. М., Жданович Е. С., Преображенский Н. А.* Хим.-фарм. ж., 1967, 11, 26.
38. *Okada S., Nagase O., Shimizu M.* Chem. and Pharm. Bull., 1967, 15, 713; *Shimizu M., Nagase O., Hosokawa Y., Tagawa H.* Tetrahedron, 1968, 24, 5241.
39. *Baddiley J., Buchanan J., Letters R. J.* Chem. Soc., 1958, 1000.
40. *Fogarty L., Rees W.* Nature, 1962, 193, 1180.
41. *Michelson A. J.* Chem. Soc., 1958, 2055.
42. *Holy A., Prishell, Coll.* Czechosl. Chem. Comm., 1967, 32, 3719.

43. Колодкина И. И., Юркевич А. М., Преображенский Н. А. ЖОХ, 1966, 36, 442.
44. Shimizu M., Nagase O., Okada S., Hosokawa X., Tagawa H., Abiko Y., Suzuki T. Chem. and Pharm. Bull., 1967, 15, 655.
45. Grüber W., Lynen F. Lieb. Ann., 1962, 650, 139.
46. Копелевич В. М., Жданович Е. С., Преображенский Н. А. Тезисы докладов советско-индийского симпозиума по химии природных соединений. М., 1968, 36.
47. Shimizu M. Chem. Pharm. Bull., 1970, 18, 313.
48. Shimizu M. Chem. Pharm. Bull., 1970, 18, 838.
49. Shimizu M., Suzuki T., Hosokawa X., Nagase O., Abiko X. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, 35, 102.

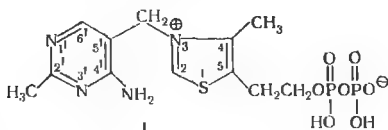
КОФЕРМЕНТЫ ПРОЦЕССОВ СИНТЕЗА И ИЗОМЕРИЗАЦИИ

НОВЫЕ АСПЕКТЫ ХИМИИ ТИАМИНА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ТИАМИНДИФОСФАТА В РЕАКЦИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО И НЕОКИСЛИТЕЛЬНОГО ДЕКАБОКСИЛИРОВАНИЯ α -КЕТОКИСЛОТ

Л. С. ХАЙЛОВА, А. М. ЮРКЕВИЧ, С. Е. СЕВЕРИН

*Всесоюзный научно-исследовательский витаминный
институт, Москва, и Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова*

Тиаминдифосфатом (ТДФ) или кокарбоксилазой (I) называют пирофосфорный эфир витамина В₁:

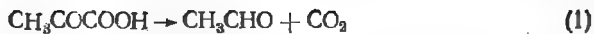


ТДФ-содержащие ферменты катализируют ряд превращений α -кетокислот, протекающих как альдольный синтез, или обратные реакции — альдольное разуплотнение. Приведенные ниже примеры дают представление об участии производных ТДФ в процессах такого типа.

С реакциями альдольного синтеза и расщепления связаны биосинтетические превращения углеводов и их фосфорных эфиров, которые также проходят с участием ТДФ-ферментов (транскетолазные и фосфокетолазные реакции).

Среди ферментов, требующих для своего действия присутствия тиаминдифосфата (ТДФ), важную группу составляют декарбоксилазы α -кетокислот. Наиболее известной и лучше других изученной реакцией, катализируемой ферментами этой группы, является реакция декарбоксилирования пировиноградной кислоты.

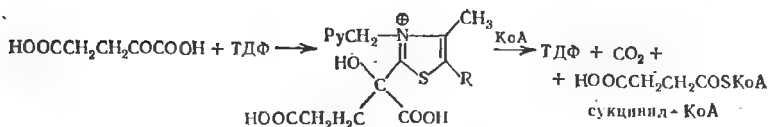
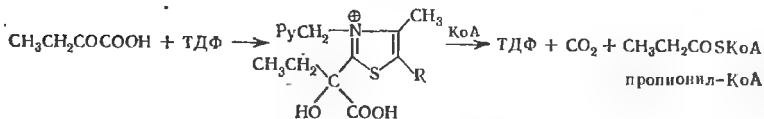
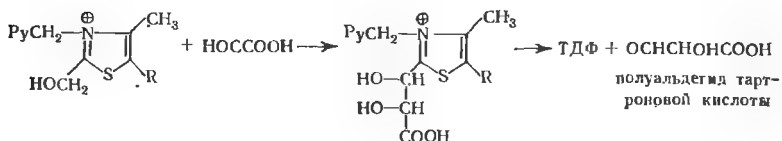
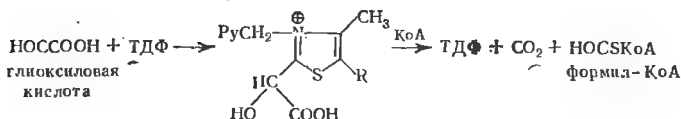
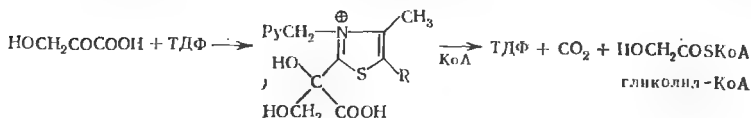
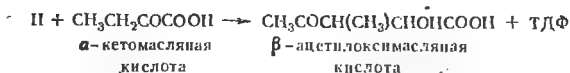
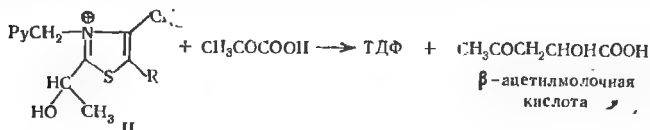
В результате декарбоксилирования, катализируемого декарбоксилазой дрожжей (КФ 4.1.1.1), происходит образование уксусного альдегида (реакция 1).

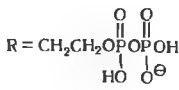
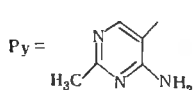
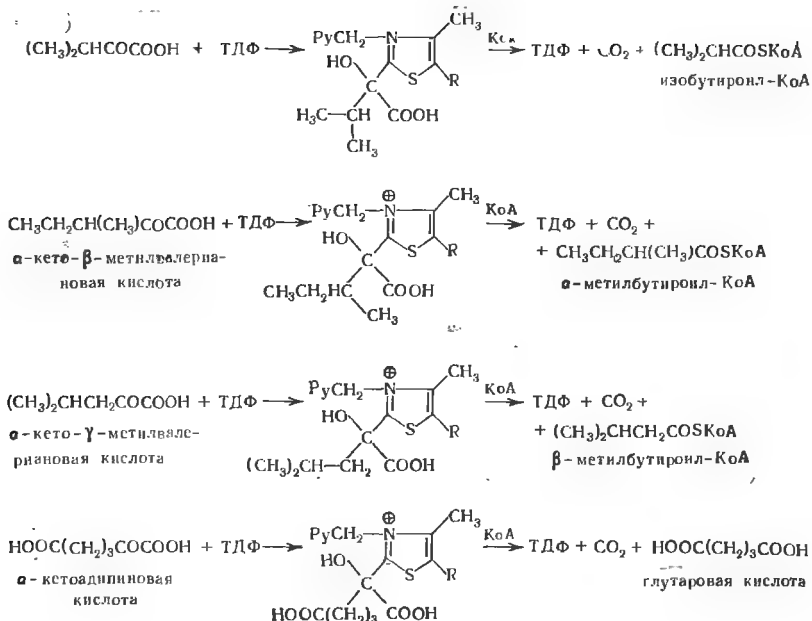


Если отщепление CO_2 от пировиноградной кислоты сопровождается окислением молекулы субстрата, то продуктом реакции является уксусная кислота (реакция 2).



Обе реакции характерны главным образом для микроорганизмов. В тканях животных окислительное декарбокси-





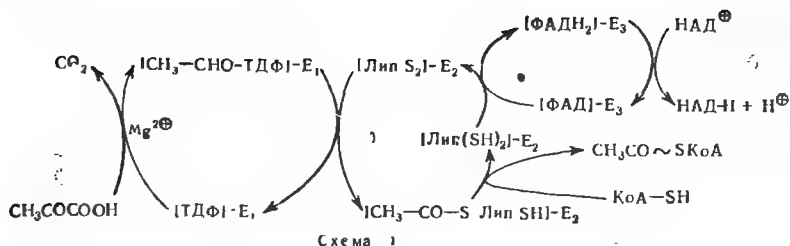
лирование пировиноградной кислоты приводит к образованию активной формы уксусной кислоты — ацетилкофермента А (ацетил-КоА).

Этот процесс катализируется пируватдегидрогеназой (КФ 1.2.4.1) (реакция 3).



Уравнение 3 суммирует каталитическое действие пируватдегидрогеназного комплекса, состоящего из нескольких ферментов. Более полное представление о процессах, осуществляемых отдельными ферментами этого комплекса, дает схема 1.

Из схемы видно, что в последовательность сопряженных реакций поочередно включаются 3 различных фермента E_1 , E_2 и E_3 . Для действия каждого из них необходимы разные кофакторы:



ТДФ и Mg^{2+} для пируватдекарбоксилазы E_1 , липоевая кислота и КоА для липоилтрансацитилазы E_2 и флавин и НАД для липоилдегидрогеназы E_3 .

В нативном состоянии ферменты не функционируют порознь, а образуют надмолекулярный белковый комплекс, в пределах которого и осуществляются реакции, указанные в схеме 1. В настоящее время в целях подробного изучения механизма действия комплекса пируватдегидрогеназы (ПД) эти ферменты изолированы и показано, что каждый из них катализирует отдельные этапы суммарного процесса.

В данном обзоре мы не будем касаться механизма действия липоилдегидрогеназы и липоилтрансацитилазы и всего комплекса ПД в целом. Обсуждая механизм окислительного декарбоксилирования пируватдегидрогеназы, мы рассмотрим только данные, которые касаются первого этапа пируватдегидрогеназной реакции — собственно декарбоксилирования субстрата и его окисления. Из схемы 1 видно, что указанные превращения катализируются пируватдекарбоксилазой (E_1) и требуют участия ТДФ и Mg^{2+} .

Для ферментов окислительного и неокислительного декарбоксилирования сходным является не только тип катализируемой реакции, но и требование одних и тех же кофакторов — ТДФ и Mg^{2+} .

Рассмотрим механизм участия ТДФ в обоих процессах. В 1949 г. Uga и др. показали, что соединения тиазолия, в том числе и тиамин, катализируют ацилоиновою конденсацию альдегидов [1]. По аналогии с ацилоиновою конденсацией, катализируемой цианидом, Mizuhara и др. предположили, что активным центром тиамин может быть азот тиазолия [2, 3]. С другой стороны, изучение таких производных тиамин, как 4'-N-метилтиамин и хлорид 4-метил-3-бензилтиазолия, показало, что они обладают активностью тиамин, прав-

да, частичной. В связи с этим роль пиримидиновой части молекулы тиамина в катализе казалась неясной.

Breslow, исследовавший изотопный обмен у солей тиазолия, отметил высокую подвижность водорода при С-2 атоме тиазольного цикла [4]. На основании этого он предложил теорию тиаминового катализа, основной идеей которой является образование карбаниона в положении 2 тиазола (III) и присоединение к нему пирувата (или другой α -кетокислоты) с образованием промежуточного соединения (IV), способного к неферментативному декабоксилированию (схема 2).

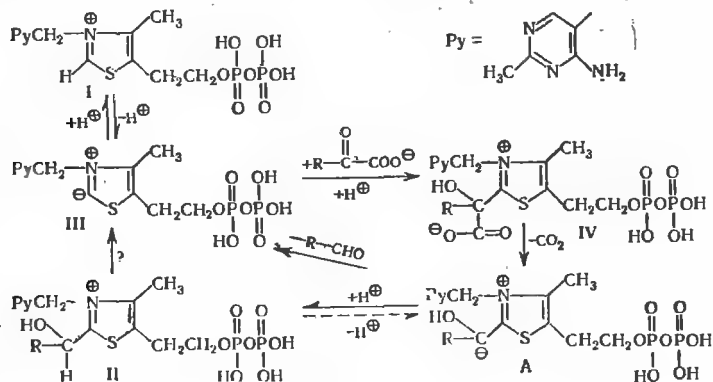
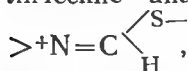


Схема 2

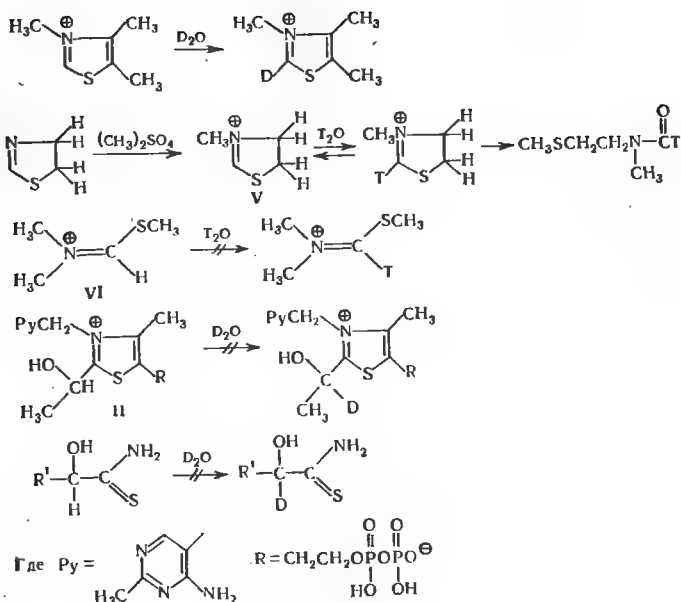
Особая подвижность водорода при С-2 тиазолия была строго подтверждена измерением кинетики обмена, которая была изучена методом ПМР [13]. Измеряли скорость изменения сигнала от протона при С-2 в D_2O . Далее было показано, что такая способность к обмену протона характерна только для производных тиазолия, так как нециклические аналоги, содержащие ту же систему связей



, не обладали такими свойствами. В опытах с

окисью трития радиоактивная метка была найдена лишь в тех случаях, когда в реакцию вводили соль тиазолиния (V). При реакции с метилированным тиоамидом (VI) тритий не включался в продукт [15].

Изучение ПМР-спектров 2-оксиэтил-ТДФ (II) и тиоамидов оксикислот показало, что обмен протона при 2- α -С-положении у соединения (II) и α -протона тиоамида также

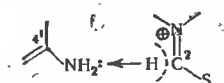


отсутствует [25]. Производные тиамин, содержащие в положении 2 метильную группу, неактивны при неферментативном образовании ацилоина. Downes, Sykes почти одновременно с Breslow пришли к заключению, что аналоги ТДФ, замещенные в положении 2, не обнаруживают активности и в ферментативных реакциях [5, 6].

Krampitz и др. синтезировали 2-(α -оксиэтил)тиамин (ОЭТ) — нефосфорилированный аналог (II) и показали, что ОЭТ заменяет тиамин в питательных средах для микроорганизмов и что из ОЭТ и ацетальдегида при pH 8,5 неферментативно образуется ацетон [6, 7]. Дальнейшим доказательством справедливости рассматриваемой схемы были результаты опытов с пируватом, меченным C^{14} по C-1 или по C-2 [85]. Когда в опыты брали 2- C^{14} -пируват, то с пируватдекарбоксилазной системой получали на хроматограмме наряду с ацетальдегидом пятна 2 меченых соединений. Из них одно соединение было относительно устойчиво, а другое — спонтанно распадалось при повторном хроматографировании. Проведение аналогичных превращений с меченным 1- C^{14} -пируватом давало только одно меченое неустойчивое соединение. Эти опыты позволили отожд-

дествить неустойчивое соединение с «активным пируватом» (IV) и предположить, что это соединение в свою очередь превращается в «активный ацетальдегид» (II). Наконец, «активный ацетальдегид» был обнаружен в качестве естественного промежуточного продукта *in vivo* [8]. Holzer и др. получили «активный ацетальдегид» из 2-С¹⁴-пирувата и ТДФ при ферментативном окислении его в присутствии дрожжевой пируватдекарбоксилазы [9—12]. Образующийся в обоих случаях 2-(α -оксипропил)тиаминадифосфат (II) был идентифицирован с помощью хроматографии и ферментативного анализа. При инкубировании меченого соединения (II) с пируватдегидрогеназой, КоА и НАД⁺ образовывался меченый ацетил-КоА. Было показано также, что предшественником 2- α -оксипропилтиаминадифосфата (II) является «активный пируват» (IV), очень неустойчивое, спонтанно распадающееся соединение.

Итак, центром каталитического действия ТДФ является биполярный ион тиазольевой части молекулы (III) (схема 2). Исследование рН-зависимости обмена протона при 2-С тиазольевого кольца показало такое быстрое дейтерирование в физиологической области значений рН, что постулированный Breslow карбанион ТДФ (III) должен возникать в достаточном для протекания реакции количестве без участия фермента [13, 14, 15]. Функция пиримидинового кольца, согласно представлениям Breslow [4], состоит в индуктивном влиянии на связь 2-С-Н тиазолия, т. е. электронная пара 4'-аминогруппы должна играть роль акцептора протона и посредством образования водородного мостика с кислотной СН-группой способствовать диссоциации протона из положения 2:



Изучение реакции декарбоксилирования α -кетокислот очищенной ферментной системой из сердца свиньи показало, что в этой системе может накапливаться «активный ацетальдегид» (II). Ферментный комплекс требует для превращения пирувиноградной кислоты в ацетил-КоА следующие кофакторы: ТДФ, липоевую кислоту, КоА, ФАД и НАД. В процессе очистки комплекс теряет КоА и НАД, и в отсутствие этих двух кофакторов в системе протекает необычная реакция, при которой накапливается «активный ацетальдегид» (II). Полученный таким образом природный

продукт представляет собой оптически-активное соединение, обладающее левым вращением [25]. Возникновение оптически-активного центра без сомнения индуцировано ферментом.

Механизм тиаминового катализа казался в основном расшифрованным. Однако некоторые данные невозможно было объяснить только на основании теории Бреслоу — Сайкса. Против идентичности оксиэтилтиаминдифосфата (II) промежуточному продукту реакции декарбоксилирования говорил факт снижения скорости образования ацетальдегида на 4 порядка при замене пирувата на (II), в то время как истинный промежуточный продукт в данной ферментативной реакции должен превращаться по меньшей мере с такой же скоростью, как исходный субстрат реакции [9, 16, 17]. Его реакционная способность либо оказывалась подавленной, либо следовало признать, что он является конечным продуктом «нефизиологической» необратимой побочной реакции. Непонятным осталось также, почему ацетальдегид не образуется по пути (II) → (III) (см. схему 2). Более того, повышенная устойчивость соединения (II) является экспериментально хорошо проверенным фактом [18—20]. Только после добавления в среду пирувата, альдегида или другого карбонильного соединения наблюдалось образование свободного ТДФ (I) [21]. Обращало на себя внимание также несоответствие скорости образования CO_2 и ацетальдегида: присоединение пирувата и его декарбоксилирование происходят относительно быстро, выделение ацетальдегида без добавки какого-либо акцептора происходит значительно медленнее, т. е. все продукты, полученные из соединения (II), образуются только путем реакций, аналогичным ацилиновой конденсации.

В связи с сильно затрудненной регенерацией карбаниона (III) по пути (II) → (III) возникло представление, что истинным промежуточным продуктом реакции является не соединение (II), а остающийся в активном центре во время декарбоксилирования «первичный» карбанион (A), являющийся настоящим «активным альдегидом», тогда как соединение (II) образуется в качестве нефизиологического продукта, если дальнейшая реакция не может иметь места из-за отсутствия какого-либо партнера, например окисленной липоевой кислоты или какого-либо карбонильного соединения. В этом случае карбанион (A) акцептирует протон из среды, образование ацетальдегида оказывается блокированным и выделяется соединение (II).

При сравнении каталитической активности тиамина и тиаминовых аналогов в модельной реакции ацилоинобразования и коферментной активности соответствующих дифосфорных эфиров оказалось, что только блокирование активного центра 2-С-тиазолия дает одинаковый результат, как в модельном тесте, так и в условиях ферментативной реакции [22]. Таким образом, реакции ацилоинобразования из ацетальдегида и из пирувата, катализируемые тиазолиевыми соединениями, являются весьма отдаленными моделями ферментативного декарбоксилирования. Результаты, полученные на этих моделях, вряд ли могут быть прямо перенесены на ферментативный катализ.

Schellenberger и др. показали (табл. 18), что в неферментативных опытах образование ацетона по действию тиамина или его аналогов зависит от нуклеофильности группы в положении 4' пиримидинового ядра [29]. Введение 4'-метиламиногруппы или 4'-диметиламиногруппы увеличивало количество ацетона в 2—3 раза против контроля — количества ацетона, образовавшегося в присутствии тиамина. Напротив, дезаминирование тиамина (опыт с 4'-окси-4'-дезаминотиамином) привело к значительному снижению выхода ацетона (почти в 2 раза) против контроля.

Juní [23] показал, что ацетальдегид является сильным, но неконкурентным ингибитором реакции декарбоксилирования. Автор пришел к выводу, что молекула фермента имеет 2 реакционных центра, один из которых присоединяет субстрат и его декарбоксилирует, другой — акцептирует образованный ацетальдегид и отдает его в среду.

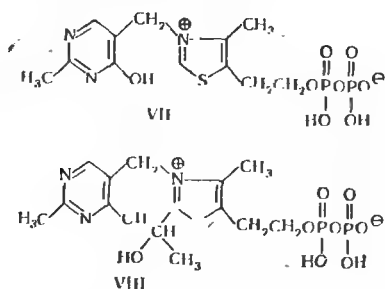
Т а б л и ц а 18

Каталитическая активность аналогов тиамина

Соединение	Каталитическая активность в модельном опыте образования ацилоина, %	
	из ацетальдегида	из пирувата
Тиамин	100	100
4'-N-метилтиамин	165	96
4',4'-N,N-диметилтиамин	281	74
4'-Окси-4'-дезаминотиамин	—	18
2-Метилтиамин	0	0

Доказательства функционирования 4'-NH₂-группы как второго активного центра ТДФ были получены при изуче-

нии коферментных свойств 4'-окси-4'-дезамино-ТДФ (окси-ТДФ) (VII).



Как показали опыты по подавлению ферментативной активности при одновременном добавлении в систему ТДФ и окси-ТДФ, последний обладает почти таким же сродством к апоферменту, как ТДФ (табл. 19). Этот вывод получил подтверждение в опытах по гелифильтрации, где была показана высокая стабильность образуемого аналогом холофермента [20]. Таким образом, отпала вероятность потери коферментной активности окси-ТДФ из-за отсутствия его связи с апоферментом.

После преинкубации аналога холофермента, содержащего окси-ТДФ, с меченым субстратом были обнаружены соответствующие аналоги «активного пирувата» и «активного ацетальдегида» (VIII), т. е. пируват не только присоединялся к 2-С тиазольного кольца, но и декарбоксилировался, в то время как отщепление ацетальдегида (расщепление «активной» 1-оксизетилтиазольной связи) блокировалось. Из этого следовало, что 4'-NH₂-группа пиримидинового кольца является необходимой активной группой молекулы ТДФ при освобождении продукта декарбоксилирования пирувата.

Функционирование аминогруппы, стоящей в положении 4-пиримидинового кольца, представлено на схеме 3. По-видимому, электронная пара 4'-NH₂-группы взаимодействует либо с протоном гидроксильной группы (путь А), либо с позитивированным (за счет оттягивания электронов тиазольным кольцом и соседним гидроксилом) α-С-2-атомом (путь Б).

Итак, участие 4'-NH₂-группы в реакции декарбоксилирования по Schellenberger сводится к ацетированию ацетальдегида из положения 2 тиазольного кольца. Следует,

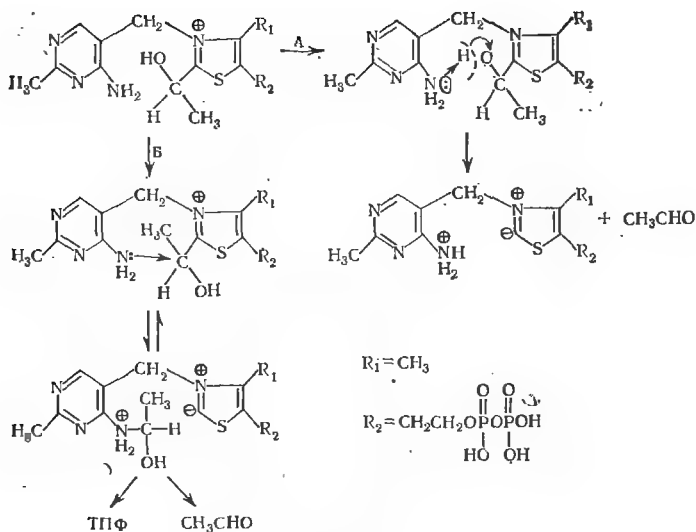


Схема 3

однако, заметить, что прямых доказательств образования промежуточного соединения (N₄-оксиэтильное производное) с ацетальдегидной группой, присоединенной к 4'-NH₂, до сих пор не получено.

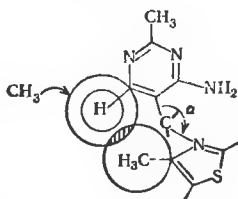
Гипотезе о бифункциональном механизме действия ТДФ должна соответствовать его конформация, обеспечивающая максимальное сближение 2 активных центров: положения 2-С тиазольного и группы 4'-NH₂ пиридинового гетероциклов. В кристаллическом состоянии и в растворе оба гетероцикла удалены. Рентгеноструктурные исследования показали, что угол (-α) между проекциями плоскостей пиридинового и тиазольного циклов приближается к 90°, что заметно отличает ТДФ от тиамин (у последнего соответствующий угол составляет 76°) [62]). В растворе допускается существование конформеров, у которых взаимное расположение двух циклов нефиксировано и лишь сравнительно редко достигается каталитически активная планарная конформация. Пространственная модель, построенная Schellenberger и др. и соответствующая рабочему взаиморасположению активных групп, показывает, что 4-CH₃- и 6'-Н-группы сближены [26]. Введение заместителей в любое из этих положений должно вызывать искажение такой конформации кофермента за счет поворота группы CH₂, соединяющей гетероциклы. Это в первую очередь должно

вызвать разделение 2 функциональных группировок. Если предложенный механизм катализа справедлив, то коферментная активность у 6'-замещенных аналогов должна отсутствовать. Действительно, введение метильной группы в положение 6' хотя и не препятствует образованию комплекса апофермента с аналогом [22, 26], однако этот комплекс

Таблица 19

**Коферментная активность и ингибиторное действие
некоторых аналогов ТДФ**

Соединение	Коферментная активность	Ингибирующий эффект при совместном действии, %
ТДФ	100	—
4'-Окси-4'-дезамино-ТДФ	0	52
4'-N-Метил-ТДФ	0	25
4',4'-N,N-Диметил-ТДФ	0	22
4'-Дезамино-ТДФ	0	30
2-Метил-ТДФ	0	10
6'-Метил-4'-окси-4'-дезамино-ТДФ	0	2
6'-Метил-4-нор-ТДФ	22	—
2'-Нор-ТДФ	24	25
4-Этил-4-нор-ТДФ	32	4
2'-Этил-2'-нор-ТДФ	48	11
5-(3-Оксипропил)-5-нор-ТДФ	0	22



каталитически неактивен (табл. 19). При удалении CH_3 -группы из положения 4 тиазольного цикла ферментная активность аналога 6'-метил-4-нор-ТДФ восстанавливается. Этот опыт можно рассматривать, как одно из серьезных доказательств правильности предложенного механизма.

Изложенные сведения о двухцентровом механизме действия ТДФ получены при изучении реакции неокислительного декарбоксилирования, катализируемой дрожжевой пируватдекарбоксилазой. Однако эта теория не может быть перенесена на процесс окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты, катализируемого ферментами

пируватдегидрогеназного комплекса без тщательной экспериментальной проверки механизма реакции. В частности, это касается вопроса, что считать объектом окисления: карбанион (А) или N₄-оксиэтильное производное (схема 3), предложенное Schellenberger с ацетальдегидной группой, присоединенной к 4'-NH₂- группе тиамина.

Участие ТДФ как в окислительном, так и в неокислительном декарбоксилировании пирувата предполагает до некоторой степени аналогию механизмов реакции в обоих случаях. Подтверждением этому является то, что, помимо окислительных реакций, пируватдегидрогеназа катализирует образование ацетоина в результате неокислительного декарбоксилирования пирувата или при реакции дисмутации диацетила [27].



По данным Moufoort в анаэробных условиях без акцепторов электронов пируватдегидрогеназа (ПД) действует как обычная декарбоксилаза, только в этом случае конечным продуктом реакции является ацетонин, а не свободный ацетальдегид [28]. Существование общего предшественника ацетата и ацетоина типа «активного ацетальдегида» предположил Schweet еще в 1951 г. [29]. Убедительные экспериментальные доказательства образования одного и того же промежуточного соединения при окислительном декарбоксилировании, катализируемом ПД из сердца свиньи, и неокислительном декарбоксилировании, осуществляемом пируватдекарбоксилазой из дрожжей, было дано Holzer в 1961 г. [9]. Рассматривая возможные превращения промежуточного продукта в различных ферментных системах, требующих для своего действия ТДФ, автор пришел к выводу, что ОЭТДФ является общим промежуточным соединением при любых превращениях α-кетокислот, связанных с их декарбоксилированием (схема 4).

В зависимости от ферментной системы, присутствующей в среде, одно и то же соединение — ОЭТДФ — является необходимым промежуточным звеном: окислительного декарбоксилирования (ПДК + искусственный акцептор электронов или ПД) — путь «а» схемы 4; неокислительного декарбоксилирования с образованием ацетальдегида (дрожжевая ПДК, отсутствие акцепторов электронов) — путь «б». При добавлении в среду ацетальдегида образуется ацетонин (в); в присутствии пирувата и ПД идет образование ацетолак-

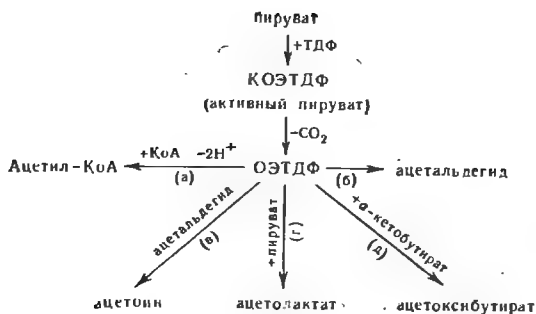


Схема 4

тата (г); если в среде присутствует α -кетобутират, то наблюдается образование ацетоксибутирата (д).

На основании исследований декарбоксилирования оксипирувата, глиоксилата, α -оксиглутарата, протекающих с образованием соответственно 2- α,β -диоксиэтил-ТДФ (ДОЭ-ТДФ), 2-оксиметил-ТДФ (ОМТДФ) и 2- α,γ -карбоксиметил-ТДФ, в настоящее время развивается представление о едином механизме ТДФ-зависимых реакций [21].

При наличии всех необходимых кофакторов 2- α,β -диоксиэтил-ТДФ в комплексе дегидрогеназ α -кетокислот образуется гликолил-КоА [63]. Последний выступает как переносчик остатка гликолевой кислоты в биосинтезе N-гликолил-нейраминной кислоты. Декарбоксилирование глиоксилата в этом же комплексе приводит к образованию 2-оксиметил-ТДФ [64]. Хотя роль этого соединения («активного формальдегида») еще не выяснена, известно, что декарбоксилирование глиоксилата усиливается в присутствии НАД и КоА. Вероятно, что в результате образуется формил-КоА. Декарбоксилирование α -кетоглутарата дало ожидаемый 2- α -окси- γ -карбоксипропил-ТДФ, который по аналогии может быть назван «активным семисукциналидегидом». Найдено, что и в транскетолазной реакции, хотя и в малых количествах, также образуется ДОЭТДФ [30].

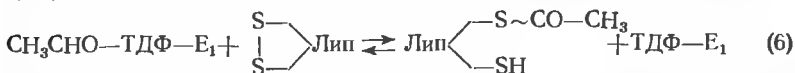
Ограничивается ли сходство механизмов катализа окислительного и неокислительного декарбоксилирования образованием общего промежуточного продукта (ОЭТДФ) или включает также передачу альдегидной группы на 4'-NH₂ остается пока открытым вопросом. Не исключено, что образование 4',N-оксиэтил-ТДФ является необходимым лишь при освобождении уксусного альдегида и не происходит при окислении липоевой кислоты в пируватдегидрогеназной

реакции. С другой стороны, если допустить, что объектом окисления является карбанион (IIa) (схема 5), то возникает вопрос: в чем заключается функция пиримидинового кольца ТДФ при окислительном декарбоксилировании? Ответ на эти вопросы должны дать дальнейшие исследования.

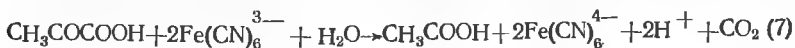
В реакции окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты функция ТДФ является более сложной, нежели в реакции простого, неокислительного декарбоксилирования. Под действием пируватдегидрогеназы (ПД) «активный» связанный с белком (E_1) и ТДФ альдегид окисляется дисульфидом — липоевой кислотой, ковалентно связанной с ферментом E_2 (см. схему 1).

Функционирование липоевой кислоты как окислителя пирувата было открыто Gunsalus и др. [31—33], которые обнаружили, что кофактор, выделенный из гидролизатов ПД, активен и в форме дисульфида, и в форме дитиола. Было продемонстрировано ферментативное ацетилирование свободной дигидролипоевой кислоты. Ацетилдигидролипоевая кислота была выделена и идентифицирована как 6-ацетил-6,8-дитиоктовая кислота. В физиологических условиях в реакции участвуют каталитические количества связанной с белком липоевой кислоты. Ее удаление вызывает полную инактивацию ПД, которая не реактивируется простым добавлением свободного кофактора.

Прямую реакцию восстановительного ацетилирования липоевой кислоты, связанной с белком, не удастся наблюдать из-за отсутствия обмена между связанным и свободным кофактором [34, 35]. Связанные с белком остатки липоевой кислоты могут быть заменены в модельных реакциях субстратными количествами свободной липоевой кислоты или ее производных. Восстановительное ацетилирование свободной липоевой кислоты или липоамида может осуществляться изолированной пируватдекарбоксилазой (E_1) по реакции



Доказано, что окисление «активного ацетальдегида» может идти и в отсутствие липоевой кислоты. В этом случае необходимым партнером реакции является какой-нибудь искусственный акцептор электронов (метиленовый синий, 2,6-дихлорфенолиндифенол, феррицианид, кислород):



Окисление этими веществами не нуждается ни в присутствии НАД или КоА, ни в участии связанной с белком липоевой кислоты [36—38]. Из кофакторов окислительного декарбоксилирования необходимыми являются только ТДФ и Mg^{2+} . Kampitz и др. [39] наблюдали окисление феррицианидом, меченного C^{14} -ОЭТДФ до C^{14} -ацетата под действием ПД из *A. aerogenes*, не содержащей липоевой кислоты. Следовательно, как и в случае физиологического окисления липоевой кислотой, так и при искусственном окислении красителем субстратом является одно и то же вещество — ОЭТДФ. Окисление пирувата искусственными акцепторами электронов идет в присутствии ПД, а также под действием изолированной ПДК. Поскольку окисление пирувата нативным кофактором и искусственными акцепторами электронов осуществляется одними и теми же ферментными препаратами, естественно предположить и сходство механизмов образования продуктов реакции.

Однако обе реакции существенно различаются. Если окислителем ОЭТДФ является липоевая кислота, то образуется богатое энергией соединение — ацетилдигидролипоевая кислота; если окислителем служит феррицианид, то образуется энергетически бедный продукт — ацетат. Ряд экспериментальных данных указывает на возможность протекания обеих реакций через одно и то же промежуточное соединение — 2-ацетил-ТДФ.

По данным Ingraham [40], энергия связи в смешанном ангидриде уксусной кислоты и тиазолового гетероцикла равна ~ 15 ккал/моль. Таким образом, доказательство образования 2-ацетил-ТДФ при окислении пирувата одновременно было бы конкретизацией места первичного образования химической связи, аккумулирующей энергию окисления.

Авторы работы [38] обнаружили, что в реакционной смеси, содержащей необходимые компоненты феррицианид-зависимого окисления пирувата, катализируемого ПД из *E. coli* (а также изолированной ПДК), в присутствии фосфата накапливается вещество, реагирующее с гидроксил-амином с образованием гидроксамовой кислоты. Последняя была идентифицирована как ацетогидроксамовая кислота. Вещество, дающее гидроксамат, обнаруживало лабильность при нагревании, подвергалось арсенолиту в присутствии арсенита, КоА и фосфотрансацетилазы (ФТА), а также связывалось гексозофосфорилирующей системой, содержащей ацетокиназу, уридиндифосфат (УДФ), глюкозу и

гексокиназу. На основании этих данных анализируемое вещество было признано ацетилфосфатом.

Krampritz и др. нашли, что скорость окисления C^{14} -ОЭТДФ феррицианидом, катализируемого ПД из *A. aerogenes*, не содержащей липоевой кислоты, увеличивается в присутствии фосфата, а в среде обнаруживается ацетилфосфат [39]. Образование ацетилфосфата в подобных условиях отмечалось и другими авторами [38].

С другой стороны, изучение химии солей тиазолия показало, что это чрезвычайно активные ацетилирующие агенты. Так, Breslow и McNelis нашли, что нитрат 2-ацетил-3,4-диметилтиазолия способен с большой скоростью ацетилировать метанол [41]. Высокая бензоилирующая активность солей 2-бензоилтиазолия показана в работе [40]. Эти исследования, а также данные [42], обнаружившие образование гидроксамовой кислоты в водном растворе 2-ацетил-3,4-диметилтиазолия или тиоэфиров в неводных растворах, позволяют считать соли ацетилтиазолия высокоэнергетическими соединениями [40, 42].

Итак, хотя прямые данные об образовании ацетил-ТДФ в реакции окислительного декарбоксилирования пирувата и отсутствуют, изложенные экспериментальные факты, полученные, с одной стороны, на основании изучения катализируемого процесса в присутствии искусственных акцепторов электронов, с другой — являющиеся результатом изучения химии предполагаемого промежуточного соединения, с достаточной вероятностью указывают на реальность предположения, что первичным высокоэнергетическим продуктом реакции является 2-ацетил-ТДФ. Если это действительно так, то образование ацетил-ТДФ можно считать реакцией аккумуляции энергии окисления, а последующие реакции как перенос накопленной энергии. Breslow, основываясь на химических моделях, рассматривает окисление пирувата липоевой кислотой как простое отнятие 2 электронов и протона от продукта декарбоксилирования пирувата (соединения IIa, см. схему 2), приводящее к образованию 2-ацетил-ТДФ (IX) [14]. По мнению автора, сначала происходит образование промежуточного комплекса ОЭТДФ и липоевой кислоты XI. Далее Breslow считает возможным два пути образования конечных продуктов: 1) расщепление комплекса до дигидролипоата и ацетил-ТДФ (IX) и перенос ацетила на дигидролипоевую кислоту; 2) расщепление промежуточного комплекса до ильида ТДФ и ацетилдигидролипоата (X) (схема 5).

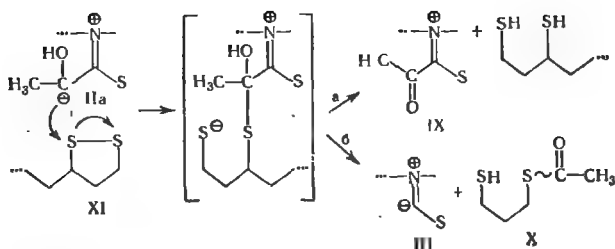


Схема 5

Первый путь означает, что ОЭТДФ (II) окисляется липоевой кислотой до ацетил-ТДФ (IX) так же, как это происходит при окислении искусственными акцепторами электронов, а ацетилирование липоата составляет отдельную ступень, следующую после его восстановления. Второй путь представляет собой другую возможность, которая исключает образование ацетил-ТДФ (IX). В этом случае ацетилирование липоевой кислоты происходит во время ее восстановления, т. е. окисление альдегидной группы должно происходить на уровне липоевой кислоты. Однако последовательность превращений, включающую ацетил-ТДФ (IX), Breslow считает тем более вероятной, что, согласно его расчетам, этот компонент обладает большей энергией, чем ацетилдигидролипоат.

Возможность образования промежуточного комплекса ОЭТДФ и липоевой кислоты, предсказанная Breslow [14], Э. Косовером [43] и Л. Л. Ингремом [44], впоследствии получила и экспериментальное подтверждение. Удалось синтезировать фотохимическим путем продукт конденсации оксиэтилтиамина и липоевой кислоты [45]. Соединение обнаруживало химические свойства тиамина и липоевой кислоты, а в опытах с меченым оксиэтилтиамином было показано, что оно содержит также оксиэтильную группу. Было обнаружено также присутствие одной тиоловой группы в молекуле. Спектральная характеристика вещества соответствовала предполагаемой структуре, т. е. комплексу оксиэтилтиамина, связанного с S-атомом α -липоевой кислоты через оксиэтильную группу. Оказалось, что продукт не только заменяет тиамин и липоевую кислоту в питательных средах для микроорганизмов, требующих этих веществ, но и заменяет пируват в реакции окислительного декарбоксилирования, катализируемой пируватдегидрогеназой из *E. coli* и из сердца свиньи. В связи с этим образование по-

добного соединения кажется вполне вероятным и в ферментативной реакции.

Несколько не согласуются с концепцией окисления оксигильной группы на уровне ТДФ, приводящего к образованию высокоэнергетического ацетил-ТДФ (IX), данные, полученные при изучении ингибиторного действия ионов кадмия на дегидрогеназу α -кетоглутаровой кислоты. Sanadi и др. обнаружили необходимость присутствия субстрата и КоА для инактивации [46]. Это значит, что свободный дитиол образуется только после передачи ацила на КоА (путь «б» на схеме 5). Однако, по мнению Sanadi, следует принимать во внимание некоторые кинетические и стерические факторы, препятствующие взаимодействию дисульфида, образованного на пути «а» (см. схему 5), с ингибиторами [47]. Во-первых, окисление альдегидной группы и передача ацетила на дигидролипоевую кислоту, по всей вероятности, происходят почти одновременно, и, таким образом, блокатор не успевает связать дитиол. Во-вторых, возможно, что стерическое состояние липоевой кислоты, образованной в результате окисления альдегидной группы до ацила, отличается от состояния дигидролипоата, доступного действию флавопротеида (E_3) (см. схему 1, действие пируватдегидрогеназы).

К числу других экспериментальных данных, указывающих на возможность окисления на уровне липоевой кислоты, относятся данные, полученные Gunsalus [31]. При добавлении липоевой кислоты к системе ПД из *S. faecalis*, не содержащей этого кофактора, наблюдалось увеличение скорости окисления пирувата феррицианидом. В связи с этим Reed [35] и Sanadi [47] считают возможным действие феррицианида в 2 местах — до и после липоевой кислоты в реакционной последовательности. Однако, такая способность, по-видимому, не является общей для всех искусственных окислителей пирувата. С. В. Шестаков [48], используя хлорвиниларсиноксид (блокатор преимущественно дитиолов) в концентрации 10^{-3} М, наблюдал уменьшение активности ПД грудной мышцы голубя в системе с феррицианидом, в то время как А. А. Глемжа [49], применяя в качестве искусственного акцептора электронов дихлорфенолиндифенол (2,6-ДХИФ), подобного эффекта блокаторов дитиолов не обнаружил.

Таким образом, функция ТДФ в реакциях окислительного декарбоксилирования усложняется не только фактом участия в акте окисления «активного альдегида» до ацетата, но и предполагаемым участием в образовании соеди-

нения с высоким групповым потенциалом — 2-ацетил-ТДФ. О соединении ТДФ с белками известно немного. Могеру, Juni исследовали условия связи и разобщения ТДФ и Mg^{2+} с некоторыми ферментами [50]. Для удаления не связанных с белком кофакторов был использован метод гель-фильтрации, после чего количество оставшегося холофермента определялось из соотношения наблюдаемого уровня активности и максимальной активности, обнаруживаемой в условиях насыщения фермента кофакторами. Результаты исследования показали большие различия в способности ферментов связывать кофакторы.

Пируватдекарбоксилаза (ПДК) из дрожжей и из *Lym. mobilis*, α -ацетолактосинтетаза и глиоксалаткарболигаза связывают ТДФ необратимо, в то время как пируватоксидаза (*Proteus vulgaris*), пируватдегидрогеназа (*E. coli*) и диацетилкарболигаза образуют диссоциирующий комплекс с ТДФ. ПДК, выделенная из дрожжей, только на 80% насыщена кофакторами. В присутствии избытка кофакторов в растворе такой фермент может быть реконструирован на 97%. Разобщенная ПДК в этих же условиях реконструируется только на 90%. Оставшиеся 10% апофермента, хотя и способны к каталитическому действию в присутствии избытка кофакторов, однако, по-видимому, претерпевают какие-то изменения при диссоциации, так как не способны больше к прочному связыванию ТДФ. Неочищенные препараты ПДК из *Lym. mobilis* и α -ацетоацетатсинтетазы способны лишь на 80 и 67% соответственно необратимо связывать кофермент.

Способность одного ТДФ активировать ферменты неоднократно отмечалась. Однако для достижения максимальной активности требуются большие концентрации ТДФ, чем при совместном присутствии ТДФ и Mg^{2+} . Эффект ТДФ в отсутствие добавленных металлов наиболее выражен у пируватоксидазы из *Proteus vulgaris* и ПД из *E. coli*. Авторы работы [51] также наблюдали активацию лишённой кофакторов высокоочищенной ПДК из зародышей пшеницы относительно низкими концентрациями ТДФ ($1,94 \times 10^{-5} M$) без добавки ионов металла.

Поскольку реконструкция дрожжевой ПДК в присутствии одного ТДФ не приводит к образованию достаточно стабильного холоферментного комплекса, существует мнение, что в подобных случаях активация идет по пути, отличающемуся от активации обоими кофакторами [50]. Интересно в этой связи, что транскетолаза из листьев шпината требует для

реконструкции холофермента обязательного присутствия Mg^{2+} и ТДФ, в то время как аналогичный фермент из печени крысы активируется одним ТДФ и добавка ионов двухвалентных металлов не оказывает никакого эффекта [52].

Из краткого и далеко не полного перечня литературных данных, касающихся характера связи ТДФ с различными белками, очевидны определенные различия этих связей. Присоединение ТДФ к одним ферментам является необратимым, другие ферменты без труда отделяют кофермент уже при мягкой обработке. С другой стороны, в присутствии одного ТДФ или кофермента и катионов двухвалентных металлов неодинаковая потребность разных ферментов в ТДФ, а также различная способность связывающих мест одного и того же фермента к насыщению ТДФ позволяют предположить различные способы связи кофермента с белком. Наиболее полно изучена природа связи ТДФ с апоферментом ПДК из дрожжей. Показано, что, несмотря на несомненную важность пирофосфатной группировки для присоединения кофермента к белку, тиазолпирофосфат не способен к образованию стабильного комплекса с апоферментом [50]. Это указывает на участие каких-то других групп ТДФ в кофермент-белковом взаимодействии.

Schellenberger и др. использовали различные аналоги ТДФ для выявления групп кофермента, участвующих в катализе и присоединении к белку [20, 26, 53, 54]. Из всех аналогов ТДФ (см. табл. 19) только 4'-окси-4'-дезаминотДФ образует одинаковую с естественным коферментом связь с белком, так как будучи добавлен к белку одновременно с ТДФ (одновременный тест) он на 50% подавляет активность ПДК, а в присутствии Mg^{2+} образует с апоферментом стабильный комплекс. Исходя из этого, можно полагать, что 4'- NH_2 -группа не имеет значения для реконструкции холофермента.

Введение заместителя по месту другого каталитического центра, т. е. по тиазолиевому ядру, у 2-метил-ТДФ блокирует процесс образования холофермента. Аналогичный результат получен и с соединением (II). Таким образом, постулированный промежуточный продукт реакции, замещающая ТДФ, мешает образованию холофермента. По-видимому, именно с этим и связано отсутствие коферментной активности этих производных ТДФ.

Удаление метильной группы из положения 4 у 4-нор-ТДФ значительно понижает сродство аналога к апофермен-

ту. Введение в это положение этильной группы у 4-этил-4-нор-ТДФ приводит к образованию активного аналога, который довольно прочно соединяется с белком. Интересно, что введение этильной группы в положение 4 повышает сродство к белку неспособного к рекомбинации 2-метил-ТДФ. 2-Метил-4-этил-ТДФ заметно конкурирует с ТДФ при одновременном присутствии. По-видимому, алкильный радикал в положении 4 ТДФ фиксирует эту часть молекулы кофермента в некоторой гидрофобной области белка.

Пиритиаминдифосфат не обладает коферментной активностью и совсем не связывается с белком. Однако роль атома серы как места связи с апоферментом, по мнению Schellenberger, следует оценивать осторожно ввиду больших структурных отличий этого аналога от ТДФ.

При замещении атома азота пиримидинового кольца на СН-группы только 3-дезазопроизводное — 4-метил-S-(β -пиррофосфорилоксиэтил)-3-N(-2' - метил-4' - амино-5'-метиленипиридил)тиазолий обладает некоторой активностью и сродством к апоферменту. Следовательно, из 2 атомов азота пиримидинового кольца для связи с белком важен N-1, в то время как область молекулы в N-3 положении пиримидина не существенна для образования холоферментного комплекса.

Введение метила в положение 6' у 6'-метил-ТДФ полностью лишает аналог коферментной активности, хотя он и обладает еще некоторым сродством к белку. С другой стороны, после метилирования у 6'-метил-4'-окси-4'-дезамин-ТДФ полностью теряется способность конкурировать с ТДФ. В противоположность этому 6'-метил-4-нор-ТДФ активен в коферментном тесте и образует стабильный комплекс с апоферментом. Таким образом, введение метила в положение 6' блокирует катализ, хотя и допускает образование «рыхлой» связи аналога с белком. Если удалить метил из положения 4, то в результате у 6'-метил-4-нор-ТДФ появляется частичная коферментная активность, а сродство аналога к белку не отличается от сродства в положениях 4 и 6', важных для присоединения кофермента к белку.

Уже упоминалось, что конформация ТДФ, обеспечивающая пространственное сближение двух активных центров 4'-NH₂ пиримидина и C-2-тиазола, отличается от конформации вещества, определяемой в кристаллах или растворах. Правильная конформация, по-видимому, создается в ак-

тивном центре ПДК в процессе взаимодействия с белком. С ТДФ и Mg^{2+} белок образует обратимые связи в различных и независимых местах [26]. Исследование кинетики образования апо-ПДК-ТДФ и апо-ПДК-Mg — бинарных комплексов обнаружило независимость первичного присоединения кофермента и металла друг от друга и от концентрации субстрата. Отсюда следует, что присоединение ТДФ и Mg^{2+} к белку происходит в двух различных местах.

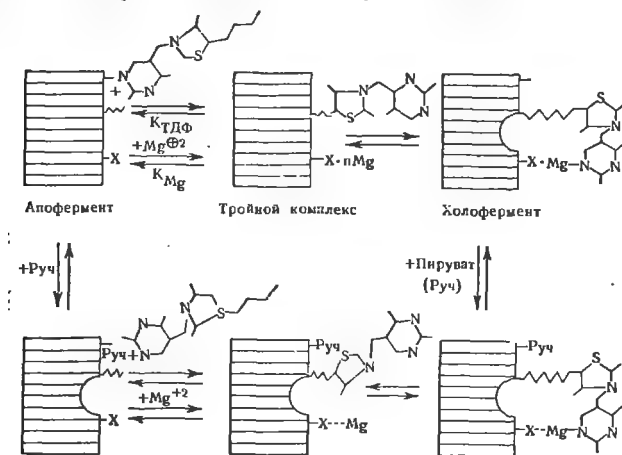


Рис. 70. Механизм образования холофермента.

Последовательность образования холофермента и его взаимодействия с субстратом по Schellenberger представлена на рис. 70 [22].

На рисунке значком (—) обозначено место связывания субстрата (пирувата); (x) — место связывания иона металла; (—) — место присоединения ТДФ.

При pH 6,8 (оптимум образования холофермента дрожжевой ПДК) происходит перегруппировка белка с образованием термодинамически стабильного тройного комплекса. Выяснено, что скорость образования холофермента зависит от природы металла и увеличивается в порядке $Mg \leq Co \leq Mn < Ca$.

Однако, каталитическая активность фермента не зависит от природы металла комплексообразователя, функция которого, вероятно, состоит в координации при связывании кофермента и апофермента [53].

Изменение конформации белка при образовании холофермента доказано рядом методов. В частности, расчет общего содержания α -спиральных структур обнаруживает увеличение последних от 23—25 до 27%. Флюоресценция белка, обусловленная в основном триптофаном, частично тушится, возможно, благодаря взаимодействию триптофановых остатков молекулы белка с ТДФ [56].

Какие же группы белка участвуют в фиксации ТДФ в активном центре фермента? Известно, что апофермент дрожжевой ПДК имеет молекулярный вес 170 000 и 4 места для присоединения ТДФ, причем 3 моля ТДФ присоединены прочно и 1 моль слабо.

Исходя из этих данных, Ullrich и др. предполагали, что молекула дрожжевой ПДК является тетрамером; каждая из субъединиц которого способна присоединять 1 моль кофермента [55]. Однако последние исследования показали, что фермент диссоциирует в 6 М солянокислом гуанидине только на 2 субъединицы и дальнейшего расщепления наблюдать не удалось [56].

Способ связывания ТДФ с активным центром апофермента, вызывающий изменение конформации кофермента, может включать более чем один тип взаимодействия. При этом, кроме электростатического или ковалентного типа связи пирофосфатной группировки кофермента, может наблюдаться взаимодействие с образованием молекулярного комплекса с переносом заряда. Такие комплексы с π -донорно-акцепторным взаимодействием найдены при исследовании связывания коферментов с боковыми цепями ароматических аминокислот, например триптофана, у флавиновых и пиридиновых ферментов.

Оказалось, что тиамин и ТДФ дают с триптофаном и с другими индольными производными молекулярные комплексы [65]. Эти комплексы образуются при сливании эквимольных количеств растворов реагентов и легко обнаруживаются при исследовании УФ- и ПМР-спектров. Важно отметить, что изменения в спектрах наблюдали лишь в тех случаях, когда брали тиазольные производные, т. е. соединения, имеющие четвертичный положительно заряженный атом азота (N⁺3). При изучении спектров смесей индольных соединений и производных тиазола, не замещенного в положении 3, отклонений от аддитивности в УФ-спектре не наблюдали. Изучение спектров ПМР комплекса тиамина и 3-индолилацетата показало, что наибольший сдвиг среди сигналов протонов давали мостиковые метиленовые прото-

ны при N-3 атома тиазолия. Из величин изменения химических сдвигов было вычислено расстояние между вершиной (мостиковой метиленовой группой) тиамина и плоскостью индольного цикла, которое оказалось равным 3,7 Å.

В такой конформации двугранный угол между плоскостями пиримидинового и тиазольного циклов больше 90° и 4'-NH₂-группа и 2-Н-тиазолия сближены. Таким образом может быть достигнута каталитически активная конфигурация

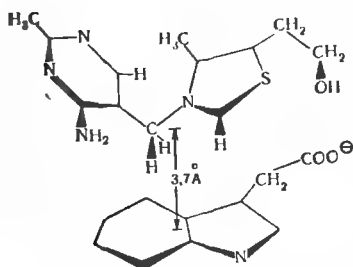


Рис. 71. Взаимное расположение тиамина и 3-индолацетата в молекулярном комплексе.

кофермента. Интересно, что определенное межмолекулярное расстояние в комплексе равно сумме ван-дер-ваальсовых радиусов взаимодействующих групп. Картина, изображенная на рис. 71, является усредненной. На самом деле происходит попеременное сближение пиримидинового и тиазольного циклов с ароматическим циклом индольного ядра. Результаты физико-химических измерений (определения константы образования, энтальпии, энтропии и т. д.) свидетельствуют о π-

донорно-акцепторном характере связи между тиамином (или ТДФ) и индольными производными [66].

Механизм декарбоксилирования неустойчивого «активного пирувата» (IV) был исследован недавно на модели, в качестве которого был избран хлорид 2-(α-оксиэтил-α-карбокси)-3,4-диметилтиазолия [67]. Изучение кинетики декарбоксилирования этого соединения до хлорид 2-(α-оксиэтил)-3,4-диметилтиазолия в воде, водном и безводном этиловом спиртах показало, что скорость декарбоксилирования этого соединения в условиях, облегчающих ионизацию карбоксильной группы, зависит от полярности растворителя. При этом чем менее полярен растворитель, тем быстрее протекает декарбоксилирование. Так, период полураспада тиазольного соединения в воде при 46° равен 24 часам, а в безводном этиловом спирте при 26° составляет всего 3,2 мин. Скорость декарбоксилирования пирувата в ферментативной реакции больше по крайней мере в 10⁵ раза, что свидетельствует, по мнению авторов, о связывании тиазольной части ТДФ в малополярной области фермента.

Действительно, анализ аминокислотного состава апо-ПДК обнаружил высокое содержание гидрофобных ароматических аминокислот, присутствие пролина и низкое содержание цистеина. В связи с тем что модельные исследования показали возможность образования комплексов между тиамином и индольными производными, не исключено, что подобные комплексы могут образовываться и при связывании ТДФ белком.

Интересным оказалось изучение взаимодействия белка с 2-толуидилнафталин-6-сульфонатом — веществом с высокой флюоресценцией только в гидрофобном окружении. Показано, что это вещество присоединяется к обширной гидрофобной области белка [57]. Половина флюоресцирующего вещества, связанного с апоферментом, необратимо замещается ТДФ и Mg^{2+} , тогда как ни Mg^{2+} , ни ТДФ по отдельности не эффективны. Вещество действует так же, как конкурентный ингибитор декарбоксилирования пирувата.

Таким образом, указанный ингибитор, по-видимому, присоединяется к белку либо в самом активном центре, либо в непосредственной близости от него. Основываясь на этих исследованиях, Ullrich предполагает, что ТДФ заключен в гидрофобный «карман», образуемый белком при построении стабильного холоферментного комплекса. В том случае, если вход в «карман» и его непосредственное окружение тоже гидрофобны, понижается доступ протонов из среды, что важно для стабилизации и дальнейших превращений первичного карбаниона.

Что касается связи ТДФ и Mg^{2+} ферментами окислительного декарбоксилирования, то этот вопрос почти совсем не изучен. Выделенные препараты комплексов ПД не содержат или очень мало содержат связанного ТДФ. Добавление одного Mg^{2+} не активирует фермент. В присутствии одного ТДФ декарбоксилирование пирувата существенно ускоряется, однако для достижения максимальной активности необходимо присутствие обоих кофакторов. Сказанное не является общим для всех ферментов окислительного декарбоксилирования α -кетокислот, в частности выделенная α -кетоглутаратдегидрогеназа содержит прочно связанный ТДФ.

При изучении декарбоксилаз, изолированных из комплексов ПД *E. coli*, грудной мышцы толубя и сердца свиньи [58, 59, 60], найдено, что активность этих ферментов блокируется тиоловыми реагентами. Их защита и реактивация

обеспечивается присутствием ТДФ. В связи с этим кажется вероятным участие сульфгидрильных групп белка в связывании ТДФ этими ферментами. Однако этот вопрос требует тщательного изучения.

Следует отметить, что изучение ферментов окислительного декарбоксилирования имеет определенные трудности, связанные с необходимостью применения модельных тестов для измерения их активности. Дело в том, что реакция 6 (см. выше), являющаяся моделью реакций, осуществляемых нативным комплексом ПД, протекает со скоростью, равной лишь 1% от скорости суммарной пируватдегидрогеназной реакции [61]. С другой стороны, реакции типа (7) не являются физиологическими, хотя широко используются для изучения ферментов окислительного декарбоксилирования. Низкая каталитическая активность изолированной ПДК в модельной реакции со свободной липоевой кислотой, по-видимому, связана с тем, что в числе других требований конформационного характера необходимым является некоторое строго определенное взаиморасположение остатка липоевой кислоты и вступающего с ним во взаимодействие ОЭТДФ. В нативном комплексе ПД осуществляется наиболее благоприятное пространственное расположение этих групп. Возможно, отличная от изолированной ПДК конформация фермента обеспечивается структурой комплекса.

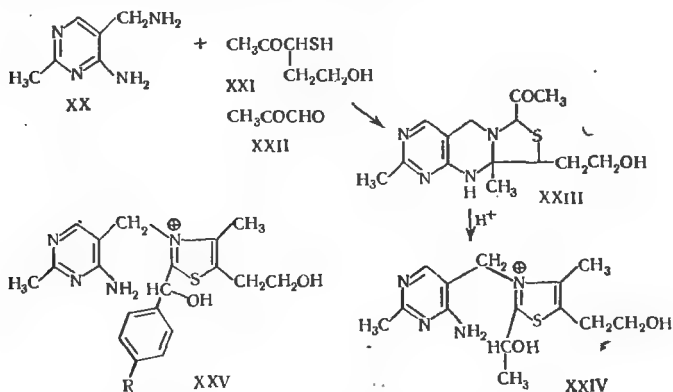
Отсюда следует необходимость разностороннего подхода как к изучению механизма окислительного декарбоксилирования, так и к изучению взаимодействия отдельных белков комплекса ПД с кофакторами. Использование различных производных ТДФ в сочетании с изучением функциональных групп соответствующего компонента комплекса ПД является одним из перспективных подходов к изучению ферментов окислительного декарбоксилирования. На основе этого изучения могут быть достигнуты новые успехи в разработке теории тиаминового катализа.

Схема тиаминового катализа Бреслоу — Сайкса целиком базируется на представлениях об особой роли 2-С-производных ТДФ. Необходимо остановиться на некоторых химических исследованиях, связанных с синтезом и реакциями таких тиазольных производных, которые, как оказалось, могут участвовать в разнообразных химических превращениях.

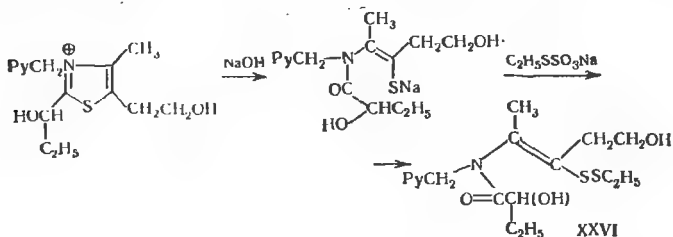
Помимо химических и энзиматических методов получения 2-оксиалкилтиазольных производных, которые заключа-

$$\begin{array}{c}
 \text{RCHC} \begin{array}{l} \text{//} \text{O} \\ \text{\textbackslash} \text{NH}_2 \end{array} + \text{O}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{Br})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OR}' \longrightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{//} \text{N} \\ \text{HC} \text{---} \text{S} \text{---} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OR}' \\ \text{\textbackslash} \\ \text{R} \quad \text{OH} \end{array} \\
 \text{XII} \qquad \text{XIII} \\
 \text{R} = \text{H, CH}_3, \quad \text{R}' = \text{H, COCH}_3, \quad \text{---} \text{O} \text{---} \text{P}=\text{O}(\text{CH}_2\text{CCl}_3)_2
 \end{array}$$


мидином (XX) меркапто-ацетопропиловый спирт (XXI) и метилглиоксаль (XXII) и гидролизовали образовавшийся трициклический продукт (XXIII) кислотой. Таким образом, был получен оксиэтилтиамин (XXIV). Когда вместо метилглиоксала (XXII) в конденсацию вводили соответствующие арилглиоксали, получали гомологи (XXV).



Недавно показано, что замещенные амиды производных тиольной формы тиамина (XXVI) могут быть получены по схеме, аналогичной синтезу дисульфидных производных витамина [71].

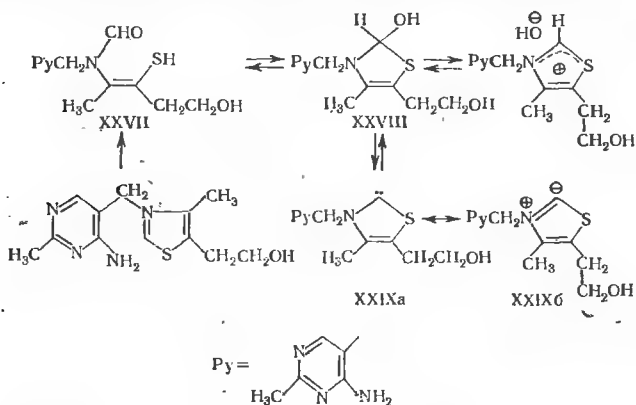


Факт синтетического получения подобного рода соединений, без сомнения, позволит в дальнейшем изучить роль производных тиольной формы кофермента, как это было сделано ранее при исследовании дисульфидных производных витамина.

Эти исследования помогли уяснить биохимический механизм депонирования тиамин в тканях различных органов. Как известно, процесс этот заключался в обратимом связывании тиольной формы тиамин за счет ее взаимодейст-

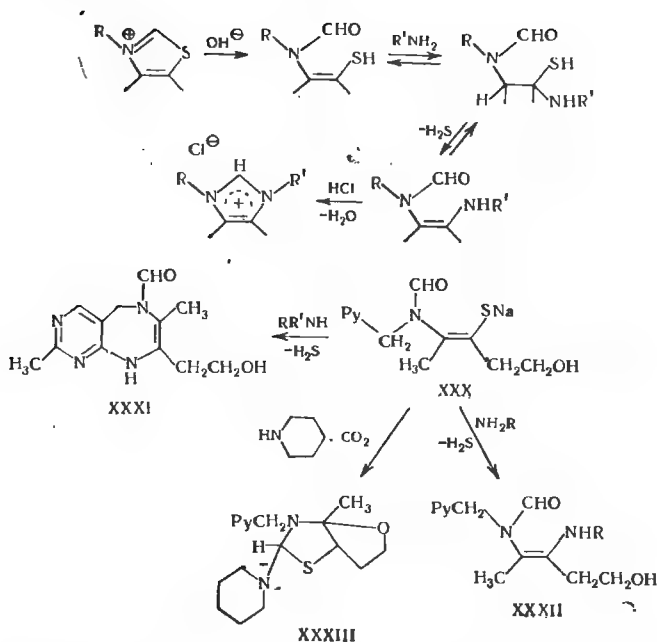
вия с дисульфидными группами и с SH-группами белка [72]. Весьма интересной представляется возможность аналогичного связывания амидов типа (XXVI); являющихся тиольными производными «активного пропионового альдегида».

По современным представлениям превращения тиамин в слабощелочных растворах описываются равновесными процессами. Было показано, что обработка тиамин эквивалентным количеством щелочи приводит к образованию малоустойчивой тиольной формы тиамин (XXVII), которая при pH 8,0 легко дает псевдооснование (XXVIII). В свою очередь основание (XXVIII) с потерей воды дает в конечном итоге илид (XXIXб), мезомерный карбену (XXIXа). Все эти превращения, важные для понимания химических свойств тиамин и его кофермента, еще не получили дальнейшей биохимической интерпретации.



Тем не менее на основании указанных превращений удалось обосновать механизм распада тиамин в присутствии аминокислот или аминов [73—76], приводящий в конечном итоге к производным имидазола, которые, как оказалось, обладают свойствами антагонистов тиамин [77].

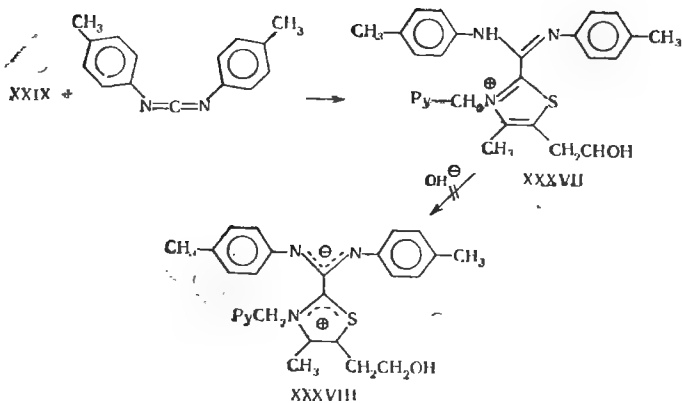
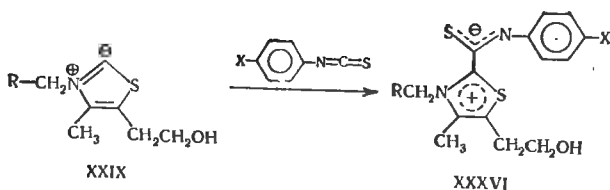
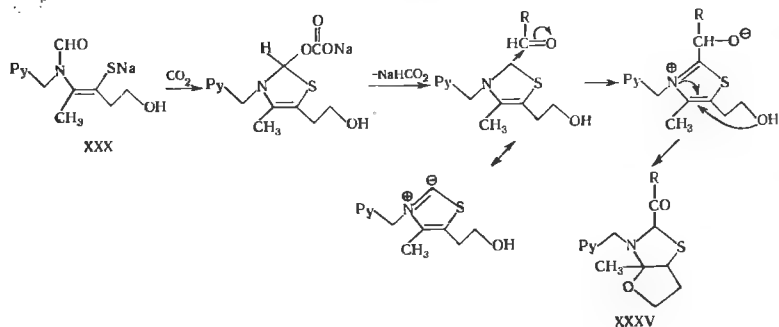
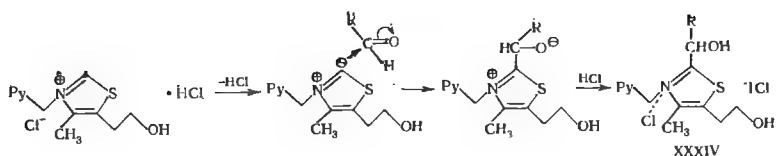
Другой тип реакций тиамин и натриевой соли тиольной формы тиамин (XXX) с аминами описан в работе [78]. В этих случаях также наблюдали отщепление серы в виде сероводорода, однако конечным результатом этих превращений были не имидазольные соединения, а гетероциклические семичленные диазины (XXXI), виниламины (XXXII) или многоядерные производные типа (XXXIII).



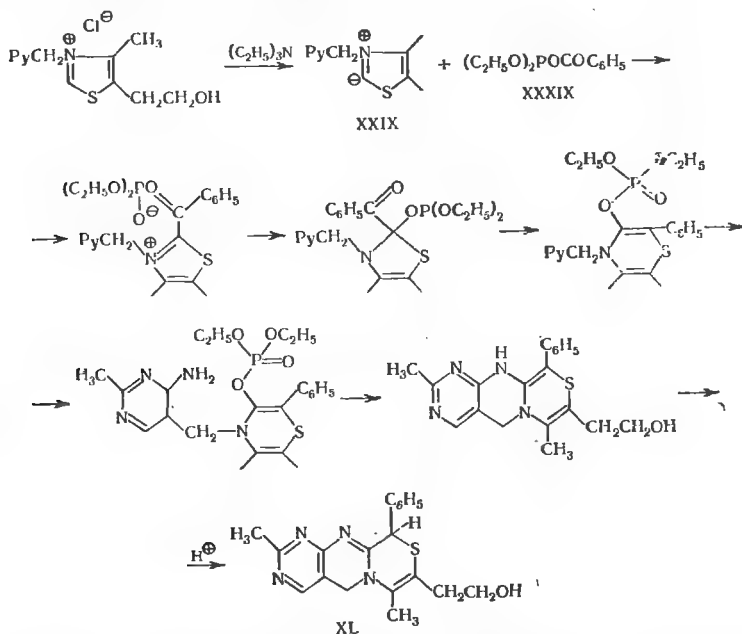
Подробное изучение реакций тиамин с альдегидами в контролируемых условиях показало, что если на соль тиола (XXX) действовать углекислотой в присутствии бензальдегида, то вместо нормального продукта 2-бензгидрилтиамин (XXXIV) образуется продукт, имеющий строение бициклического кетона (XXXV) [79, 80]. Результат в конечном итоге зависит от концентрации ионов водорода в реакционной смеси. В присутствии кислоты образуется нормальный продукт (XXXIV), в отсутствие — кетон (XXXV).

Дальнейшие исследования, проводимые японскими химиками [81] с тиазолиевыми илидами — производными тиамин, привели их к открытию реакции илида (XXIX) с арилизоотиоцианатами, дающей резонансно-стабилизированные биполярные ионы (XXXVI). Интересно отметить, что синтезированные соединения содержат устойчивую неклассическую биполярную структуру. Взаимодействие илида (XXIX) с п-толилкарбодиимидом привело к соединению (XXXVII), которое не давало илида (XXXVIII).

Наконец, изучение реакции илида (XXIX) с диэтилбензоилфосфонатом (XXXIX) позволило получить трицикли-



ческие производные (XL), которые обладали свойствами анальгетиков, седативным и антиандрогенным действием и транквилизаторной активностью [82, 83, 84].



Подводя итоги рассмотрению химических превращений тиамина и ТДФ можно заметить, что далеко еще не все возможные направления реализуются с участием ферментов. Из этого вовсе не следует, что и впоследствии эти реакции не будут найдены в биохимических процессах. Важно отметить, что эти химические исследования не только составляют прочный фундамент для последующего развития молекулярной энзимологии применительно к V_1 -зависимым ферментам, но и обеспечивают клинику тиаминовыми препаратами с широким спектром терапевтической активности.

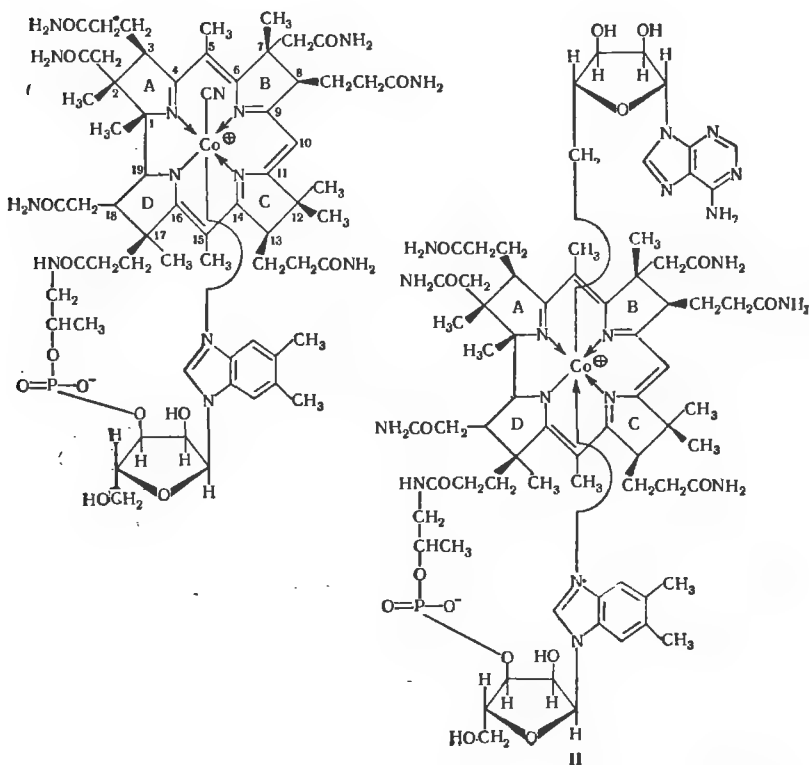
ЛИТЕРАТУРА

1. Ugai T., Tanaka R., Dokawa T. J. Pharm. Soc. Japan, **63**, 296 (1943).
2. Mizuhara S., Tomura K., Arata H. Proc. Japan Acad., 1951, **27**, 302.
3. Mizuhara S., Handler P. J. Amer. Chem. Soc., 1954, **76**, 571.
4. Breslow R. Chem. a. Ind., 1957, 893.
5. Downes J., Sykes P. Chem. a. Ind., 1957, 1095.
6. Krampitz L., Greull G., Suzuki J. Fed. Proc., 1959, **18**, 266.

7. *Krampitz L., Greull G., Miller C., Bicking J., Skeggs H., Spragul J.* J. Am. Soc., 1958, 80, 5893.
8. *Carlson G., Brown G. J.* Biol. Chem., 1961, 236, 2099.
9. *Holzer H.* Angew. Chem., 1961, 73, 721.
10. *Holzer H., Fouseck-Wollheim F., Kohlhaw G., Woeckhaus Ch. W.* Ann. N. J. Acad. Sci., 1962, 98, 453.
11. *Holzer H., Goedde H., Goggel K., Ullrich B.* Biochim. Biophys. Res. Commun., 1961, 3, 599.
12. *Scriba P., Holzer H.* Biochem. Z., 1961, 334, 473.
13. *Ullrich J., Mannschreck A.* Biochim. Biophys. Acta, 1966, 115, 46.
14. *Breslow R.* Ann. N. J. Acad. Sci., 1962, 98, 445.
15. *Hoffert W., Lindin B., Ingraham L.* Biochemistry, 1964, 3, 1172.
16. *Goedde H., Ullrich B., Stalman C., Holzer H.* Biochem. Z., 1965, 343, 204.
17. *Holzer H., Baucamp K.* Biochim. Biophys. Acta, 1961, 46, 225.
18. *Goedde H. Z.* Vitaminforsch., 1963, 33, 18.
19. *Jatco-Mannzo E., Roddy E., Jonnt R., Metzler D. J.* Biol. Chem., 1959, 234, 733.
20. *Schellenberger A., Müller V., Winter R., Hübner G. H.* — S. Z. Physiol. Chem., 1966, 344, 244.
21. *Ullrich J., Deus B., Holzer H.* Int. Z. Vit. Forsch., 1968, 38, 273.
22. *Schellenberger A.* Angew. Chem., 1967, 79, 1050.
23. *Juni E. J.* Biol. Chem., 1961, 236, 2306.
24. *Mieyal J., Votaw R., Krampitz L., Sable H.* Biochim. Biophys. Acta, 1967, 141, 205.
25. *Ullrich J., Mannschreck A.* Eur. J. Bioch., 1967, 1, 110.
26. *Schellenberger A. H.* — S. Z. Physiol. Chemie, 1967, 348, 506.
27. *Green D., Stumpf P., Zarudnaja K. J.* Biol. Chem., 1947, 167, 811.
28. *Moufoort C.* Biochim. Biophys. Acta, 1955, 16, 219.
29. *Schweet R., Fuld M., Cheslock K., Paul M.* В кн.: Phosphorus metabolism. V. 1, 1951, 246.
30. *Pohlandt F., Kohlhaw G., Holzer H. Z.* Naturforsch., 1967, 226, 407.
31. *Gunsalus I.* В кн.: Mechanism of Enzyme Action, 1954, 545.
32. *Gunsalus I., Barton L., Gruber W. J.* Am. Chem. Soc., 1956, 78, 1763.
33. *Gunsalus I., Smith B.* Proc. Int. Symp. Enzyme Chemistry. Tokyo — Kyoto, 1957. Tokyo, 1958, 77.
34. *Reed L., Koike M., Levitch M., Leach F. J.* Biol. Chem., 1958, 232, 143.
35. *Reed L.* В кн.: The Enzymes. V. 3, 1960, p. 195.
36. *Koike M., Reed L. J.* Biol. Chem., 1960, 235, 1931.
37. *Sanadi D., Landley M., White F. J.* Biol. Chem., 1959, 234, 1831.
38. *Das M., Koike M., Reed L.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1961, 47, 753.
39. *Krampitz L., Suzuki Y., Greull G.* Fed. Proc., 1961, 20, 971.
40. *White F., Ingraham L. J.* Am. Chem. Soc., 1960, 82, 4114.
41. *Breslow R., McNelis E. J.* Amer. Chem. Soc., 1960, 82, 2394.
42. *Daigo R., Reed L. J.* Amer. Chem. Soc., 1962, 84, 659.
43. *Косовер Э.* Молекулярная биохимия. М., 1964.
44. *Ингрэм Л. Л.* Механизмы биохимических реакций. М., 1964.
45. *Obishi N., Fukui S.* Biochim. Biophys. Acta, 1965, 20, 21.
46. *Sanadi D., Langley M., Searls R. J.* Biol. Chem., 1959, 234, 178.
47. *Sanadi D.* В кн.: The Enzymes, 1963, 7, 307.
48. *Шестаков С. В.* Стабилизация мышечной пируватдегидрогеназы имидазольными соединениями. Дисс. канд. М., 1963.

49. *Глемжа А. А.* Изучение мышечной пируватдегидрогеназы. Дисс. канд. М., 1966.
50. *Morey A., Juni E. J.* Biol. Chem., 1968, 243, 3009.
51. *Singer T., Peusky Y. J.* Biol. Chem., 1952, 196, 375.
52. *Horecker B., Smyrniotis P., Klenow H. J.* Biol. Chem., 1953, 205, 661.
53. *Schellenberger A., Hübner G. H.* — S. Z. Phys. Chemie, 1967, 348, 491.
54. *Schellenberger A., Wendler K., Creutzburg P., Hübner G. H.* — S. Z. Phys. Chemie, 1967, 348, 501.
55. *Ullrich U., Wittorf Y., Gubler C.* Biochim. Biophys. Acta, 1966, 113, 595.
56. *Ullrich U.* Angew. Chem. (internatl. Ed), 1969, 8, 82.
57. *Ullrich U., Donner I. H.* — S. Z. Physiol. Chemie, 1970, 351, 1030.
58. *Schwartz E., Reed L. J.* Biol. Chem., 1970, 245, 183.
59. *Koike M., Hamada M., Koike K.* 8th Internatl. Kongress of Biochemistry, Schweiz, 1970; Abstracts, 1970, 253.
60. *Severin S., Hylova L., Gomazkova V.* 8th IKB. Abstracts, 1970, 117.
61. *Reed L., Cox D.* Ann. Rev. of Biochem., 1966, 35, 57.
62. *Karle L., Britts K.* Acta crystalogr., 1966, 20, 118.
63. *Da Fonseca-Wollheim, Holzer H.* Biochem. Zeitschr., 1964, 340, 383.
64. *Kohlhaw G., Deus B., Holzer H. J.* Biol. Chem., 1965, 240, 2135.
65. *Biaglow J., Mieyel J., Suchy J., Sable H. J.* Biol. Chem., 1969, 244, 4054.
66. *Mieyel J., Suchy J., Biaglow E., Sable H. J.* Biol. Chem., 1969, 244, 4063.
67. *Grosby J., Stone R., Lienhard G. J.* Am. Chem. Soc., 1970, 92, 2891.
68. *Kiss J., Souza R., Spiegelberg H.* Helv. Chim. Acta, 1968, 51, 325.
69. *Oka J., Yoshioka K., Hirano H.* Chem. Pharm. Bull. Japan, 1967, 15, 119.
70. *Oka J., Yoshioka K., Hirano H.* Chem. Pharm. Bull. Japan, 1967, 15, 448.
71. *Nagawa M., Mijazawa Sh., Yoshioka T., Kataoku M., Wada T.* Японск. патент 6812150, 1968; C. A., 1969, 70, 28942.
72. *Nagami H., Hasegawa J., Suzuki T., Hirata K.* Chem. Pharm. Bull., 1968, 16, 1273.
73. *Cooks R., Sykes P. J.* Chem. Soc. (C), 1968, 2864.
74. *Cooks R., Sykes P. J.* Chem. Soc. (C), 1968, 2871.
75. *Kurata G., Sakai T., Migahara T.* Bitamin, 1968, 37, 398.
76. *Kurata G., Sakai T., Migahara T.* Bitamin, 1968, 37, 403.
77. *Staab H., Schwalbach G.* Lieb. Ann., 1968, 715, 128.
78. *Takamizawa A., Hirai K., Hamashima Y.* Tetrahedron Letters, 1967, 5077.
79. *Takamizawa A., Hirai K., Hamashima Y., Matsumoto S.* Tetrahedron Letters, 1967, 5071.
80. *Takamizawa A., Hirai K., Hamashima Y., Matsumoto S., Ishiba T.* Chem. Pharm. Bul. (Japan), 1968, 16, 1210.
81. *Takamizawa A., Hirai K., Matsumoto S.* Tetrahedron Letters, 1968, 4027.
82. *Takamizawa A., Hamashima Y., Sato Y., Tanaka S., Ito H., Mori J.* J. Org. Chem., 1966, 31, 2995.
83. *Takamizawa A.* Японск. патент 6717829, 1968; C. A., 1968, 69, 19195.
84. *Takamizawa A.* Японск. патент 6720302, 1968; C. A., 1968, 69, 19189.
85. *Holzer H., Beaucamp K.* Angew. Chem., 1959, 71, 776.

Основной частью витамина B_{12} (цианкобаламина) и кобамидного кофермента является Со-комплекс азотистого макроцикла, носящего название «коррин». Корриновая система содержит 4 восстановленных пиррольных кольца, несущих в β -положениях метильные, ацетамидные и пропионамидные заместители. Макроцикл содержит 9 асимметрических атомов углерода. Все пропионамидные заместители находятся на той стороне, где нуклеотид, все ацетамидные группы—на противоположной стороне плоскости корринового кольца.

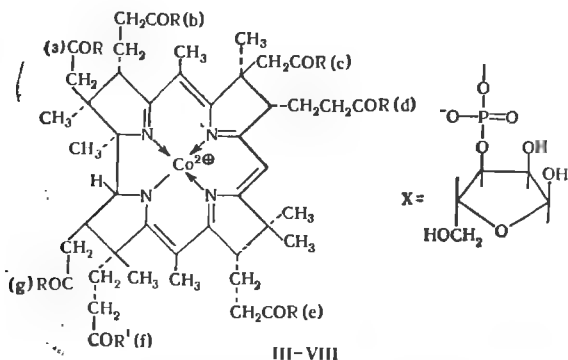


Целесообразно рассмотреть номенклатуру производных витамина B_{12} . В соответствии с этой номенклатурой различают планарный и 2 аксиальных лиганда. Роль планарного лиганда всегда выполняет гетероциклическая система коррина, которая мало отличается у различных производных витамина B_{12} . В то же время наблюдаются значительные изменения обоих аксиальных лигандов, расположенных перпендикулярно плоскости коррина. Витамином B_{12} или цианкобаламином называют такой коррин [I], у которого два аксиальных положения занимают соответственно CN-группа и остаток 5,6-диметилбензимидазолилриботида. Замещение «верхнего» лиганда (группы CN) на оксигруппу приводит к оксикобаламину или витамину B_{12a} . Таким образом, кобаламинами называют такие коррины, у которых планарный лиганд имеет структуру корринового кольца витамина B_{12} , а «нижним» аксиальным лигандом является остаток 5,6-диметилбензимидазолилриботида. Так, природный коррин, участвующий в биосинтезе метана, получил название метилкобаламина. Нумерация атомов в макроцикле приведена в формуле I. В соответствии с этими правилами кобамидным коферментом (II) называют 5'-дезоксиаденозилкобаламин, или 5,6-диметилбензимидазолил- α -риботид-5'-дезоксиаденозилкобинамид. Для унификации этих названий здесь и далее для кобамидного кофермента применяют обозначение ДБК-кофермент, подчеркивая, что речь идет именно о диметилбензимидазолильной коферментной форме. Необходимо упомянуть широко распространенное, особенно в биохимической литературе, обозначение производных витамина B_{12} различной степени восстановления. Так, продукт, образующийся в результате восстановления Co^{III} в витамине B_{12} до Co^{II} , называют витамином B_{12r} , а при дальнейшем восстановлении до Co^I — витамином B_{12s} .

Образующиеся в результате гидролиза боковых цепей кобаламина соединения получили следующие названия: кобириновая кислота (III, $R=R'=OH$), кобировая кислота (IV, $R=NH_2$, $R'=OH$), кобиновая кислота (V, $R=OH$, $R'=NHCH_2CH(OH)CH_3$), кобинамид [VI, $R=NH_2$, $R'=NHCH_2CH(OH)CH_3$], кобамидная кислота [VII, $R=OH$, $R'=NHCH_2CH(OX)CH_3$], кобамид [VIII, $R=NH_2$, $R'=HCH_2CH(OX)CH_3$] [1].

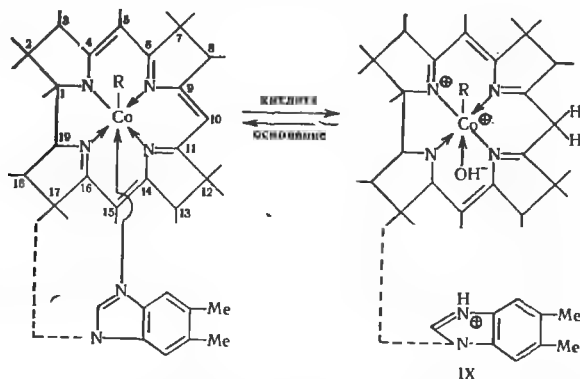
После того как было начато изучение химии корринов, сразу удалось установить, что любое структурное изменение самого коррина или его боковых цепей влечет за собой изменение активности образующегося при этом производ-

ного витамина В₁₂. В связи с этим систематические исследования химии корриноидных систем приобрели особый интерес.



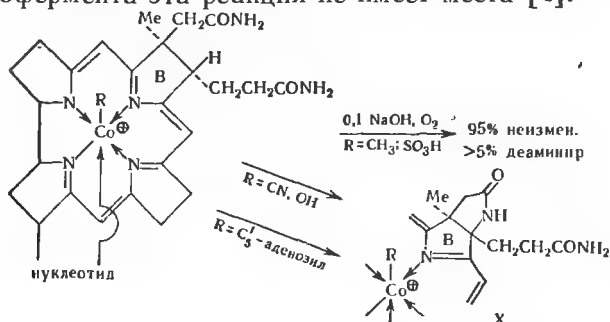
При действии сильных кислот (конц. H₂SO₄, HF, HClO₄) на витамин В₁₂ и кобинамид (VI) хромофор претерпевает большие изменения. При этом образуется желтый раствор, в УФ-спектре которого не доминирует поглощение при 360 нм (γ-полоса, характерная для сопряженной С=N системы, взаимодействующей с металлом). Красно-желтое смещение свидетельствует об обратимой протонизации хромофора витамина В₁₂, вероятно, преимущественно по С-10 [1]. В отличие от кобаламинов, изменение в спектре которых происходит лишь в концентрированной кислоте, кофермент (II) и его алкильные аналоги протонируются относительно легко уже при действии разбавленных минеральных кислот [3, 4]. Протонирование коферментных форм также характеризуется изменением цвета растворов из красного в желтый и соответственным сдвигом полос поглощения в электронных спектрах. Анализ спектров желтых протонированных форм показывает, что связь между «нижним» аксиальным лигандом — нуклеотидом и атомом кобальта разорвана и протон присоединен к нуклеотидному основанию. Однако этого изменения нуклеотидного основания недостаточно для заметного изменения цвета, которое, вероятно, вызвано также присоединением протона к системе хромофора. Кобинамид (VI), который не содержит координированного нуклеотида, тоже изменяет цвет при обработке разбавленной кислотой. Константы ионизации алкильных аналогов метилкобаламина определяют меру лег-

кости изменения цвета при протонировании. В то же время имеется корреляция между константами ионизации и индуктивным эффектом алкильных заместителей, заставляющая думать, что реакционная способность в месте протонирования тоже контролируется природой заместителя. Наиболее вероятным местом протонирования (наряду с нуклеотидом) является положение 10 (формула IX) [2].



Окислительно-восстановительные свойства витамина B_{12} представляют определенный интерес. Кобаламин является восстановителем во многих биохимических реакциях. В частности, он поддерживает глутатион в восстановленном состоянии, восстанавливает гомоцистин в гомоцистеин, поддерживает кофермент А в активной восстановленной форме и т. д. Корриновое ядро окисляется при действии кислорода воздуха в щелочной среде. Окисление протекает различным образом в случае коферментных форм и в случае циан- и оксикобаламинов. Цианкобаламин превращается в циандегидрокобаламин, вещество, близкое витамину B_{12} по физическим свойствам, но обладающее малой витаминной активностью [5]. В тех же условиях 60% ДБК-кофермента не изменяется, а 40% превращается сначала в оксикобаламин, который быстро окисляется в оксидегидрокобаламин (X); с метилкобаламином и кобаламинсульфонатом реакция не идет [6]. Так как процесс окисления приводит к образованию лактама (X), это означает, что амидные группы в ДБК-коферменте, метилкобаламине и кобаламинсульфонате более устойчивы к гидролизу. Щелочное окисление как витамина B_{12} , так и кобинамида (VI) тормозится меркаптоацетатом натрия и

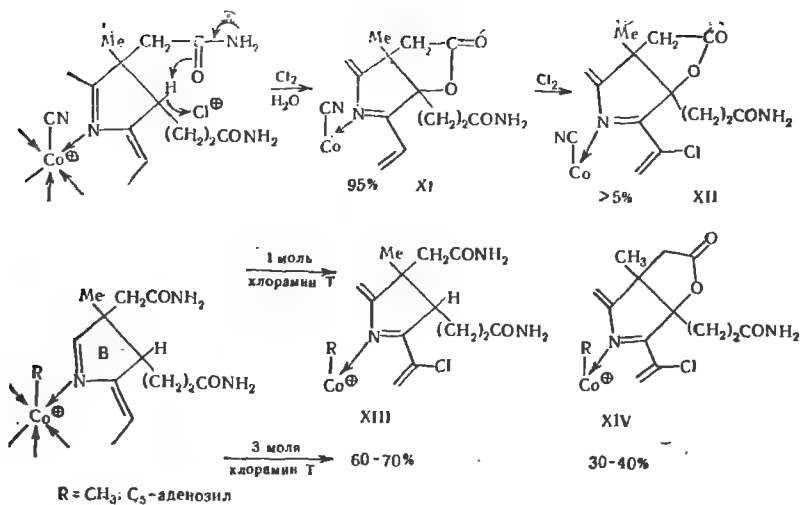
пресекается CN-ионами, которые стабилизируют комплекс трехвалентного кобальта. Если витамин B₁₂ обработать окисью серебра, то образуется лактон (XI) [5]; в случае ДБК-кофермента эта реакция не имеет места [4].



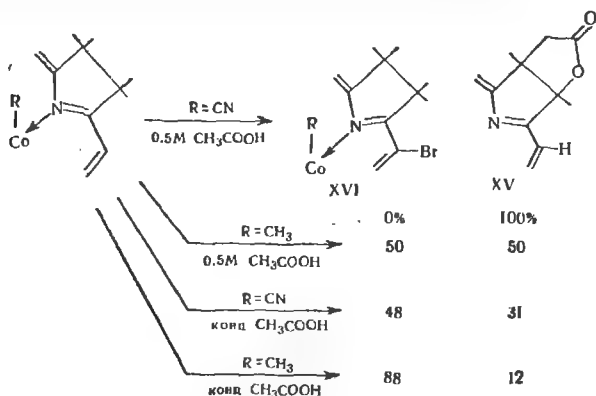
Различие в реакционной способности корринового ядра цианкобаламина и ДБК-кофермента проявляется в других реакциях. Хлорирование цианкобаламина в мягких кислых условиях ведет к окислительной циклизации с образованием лактона у кольца В (XI) [5]. Образование лактона включает окисление активированного положения 8 с участием соседнего ацетамидного остатка; дальнейшее галоидирование приводит к 10-хлорлактону (XII). Дегидровитамин B₁₂ с 1 молем хлора дает монохлорпроизводное. Батохромный сдвиг при введении хлора указывает, что замещение идет в сопряженную систему. Рассмотрение электронной плотности ведет к выводу о направлении электрофильного замещения к С-10.

Галоидирование ДБК-кофермента, метилкобаламина и кобаламинсульфоната приводит к совершенно иным продуктам [3, 4, 6]. Эти соединения при хлорировании превращаются в 10-хлорпроизводные (XIII), которые при обработке цианидом переходят в 10-хлорцианкобаламин. При обработке ДБК-кофермента и метилкобаламина тремя эквивалентами хлорамина-Т в обоих случаях образуется 60—70% 10-хлорпроизводного (XIII) и 30—40% хлорлактона (XIV). Фотолиз хлорлактона (XIV) в присутствии воздуха вызывает образование соответствующего производного оксикобаламина, которое с цианидом дает хлорлактон (XII), полученный ранее при обработке цианкобаламина избытком хлора.

Галоидирование хромофора цианкобаламина возможно и без циклизации. Бромирование в ледяной уксусной кислоте



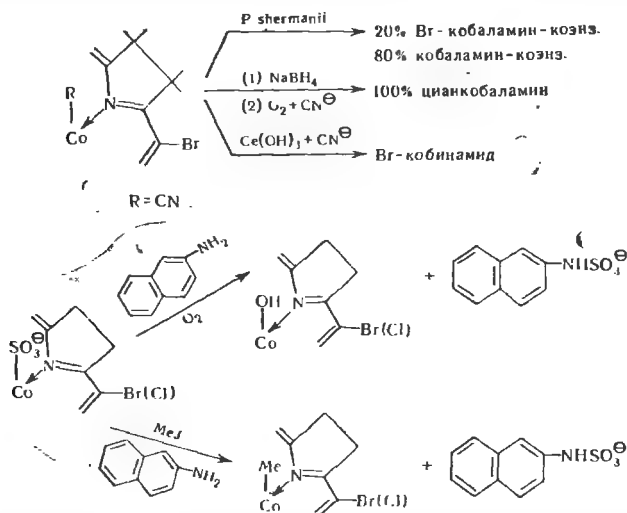
приводит к образованию 31% лактона цианкобаламина (XV) и 48% бромцианкобаламина (XVI) [7]. Та же реакция в водной уксусной кислоте приводит только к лактону. В случае метил-Со-кобаламина реакция в ледяной уксусной кислоте приводит к 88% метил-Со-бромкобаламина и 12% метил-Со-кобаламинлактона. В водной кислоте образуется 50% лактона и 50% бромпроизводного.



Бромпроизводные реагируют с восстанавливающими агентами, при этом бром замещается на водород. В отличие от бромпроизводных 10-хлорпроизводные не обменивают хлор на водород в этих условиях. Гидролиз бромцианко-

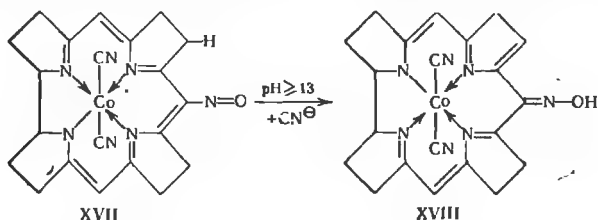
баламина приводит к бромкобинамиду. При прибавлении бромцианкобаламина к культуре *P. shermanii* получают 20% 10-бром-ДБК-кофермента и 80% ДБК-кофермента; в тех же условиях хлорпроизводное превращается в 10-хлор-ДБК-кофермент без образования кофермента.

Приведенные данные окисления и хлорирования показывают, что реакционная способность хромофора в коферментах и сульфонатах кобаламина отличается от реакционной способности циан- и оксикобаламинов. По-видимому, в корриновых макроциклах коферментов активировано положение 10, а в циан- и оксикобаламинах положение 8. Таким образом, аксиальные лиганды у атома Со оказывают влияние на реакционную способность корринового цикла. Но заместители при С-10 хромофора в свою очередь оказывают сильное влияние на прочность связи кобальта с лигандами и тем самым на его реакционную способность. Ярким примером этого является кобаламинсульфонат [7]. В хлор- и бромпроизводных этого соединения связь кобальта с серой ослаблена по сравнению с исходным кобаламинсульфонатом: эти производные реагируют с β -нафтиламином в темноте в присутствии кислорода, давая β -нафтилсульфаминовую кислоту, а в присутствии йодистого метила образуют метилкобаламин.



Цианкобаламин и метил-Со-кобаламин при действии нитрозилхлорида в ледяной уксусной кислоте превращают-

ся в 10-нитрозопроизводные (XVII), которые в темноте в присутствии цианида в щелочной среде претерпевают обратимое изменение в желтое вещество. На основании того, что нитрозодегидрокобаламин, полученный из дегидровитамина В₁₂, не изменяется в присутствии дианида в щелочной среде, сделан вывод, что желтый продукт является дициано-10-изонитрозокобаламином (XVIII). Восстановление нитрозокобаламина приводит к 10-аминокобаламину [7].



При циклизации лактама или лактона у кольца В микробиологическая ростовая активность полученных веществ исчезает [5]. Дегидровитамин В₁₂, его коферментная форма, 10-хлорпроизводные коферментных форм дегидровитамина неактивны по отношению к *E. coli* [8, 9].

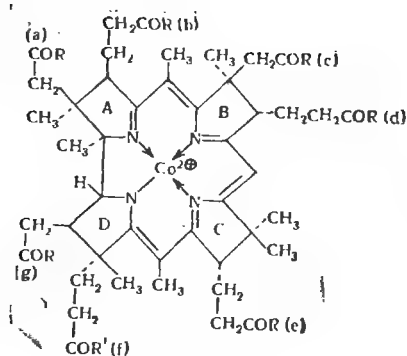
Кобамидный кофермент, хлорированный по С-10, неактивен также в системе метиласпартат-мутаза. Изучено его коферментное действие в других кобамидзависимых реакциях, в частности на системе пропандиолдегидратазы [10]. Было показано, что 10-хлор-ДБК-кофермент не превращается этой системой в кобамидный кофермент. Хлорированный кофермент способен соединяться с апоферментом в той же степени, что и сам кофермент, но каталитическая активность 10-хлоркофермент-апоферментного комплекса намного ниже. 10-Хлороксикобаламин так же, как и оксикобаламин, является конкурентом по отношению к кобамидному коферменту, ингибитором в системе диолдегидратазы. Это позволяет предположить, что хлор в положении 10 не оказывает влияния на связывание хлороксикобаламина или хлоркобамидного кофермента с белком. Измерение констант Михаэлиса и $V_{\text{макс}}$ показывает, что низкая каталитическая активность 10-хлоркофермента, вероятно, обусловлена устойчивостью $\text{Co}-\text{C}$ связи к расщеплению в ферментативной реакции вследствие изменения поляризации этой связи. Таким образом, замещение в хромофоре оказывает влияние на распределение электронной

плотности в корриновой системе и тем самым на реакционную способность корриноидных соединений.

Структурные изменения в боковых цепях коррина приводят к аналогам витамина B₁₂, которые часто являются более или менее сильными его антагонистами. Подробно изучен гидролиз амидных групп цианкобаламина [11, 12] и ДБК-кофермента [13].

Гидролиз амидных групп протекает в кислых и щелочных условиях. Кислый гидролиз приводит к ряду кислот, содержащих от одной до семи карбоксильных групп. В присутствии окисляющих агентов образуются производные лактона. При нерегулируемом гидролизе образуется 190 кислот и выделение отдельных изомеров невозможно [12]. При мягком кислом гидролизе в атмосфере азота или водорода образуется смесь трех моноосновных кислот, трех двухосновных кислот и одной трехосновной кислоты, содержащих нуклеотид. Имеется большое различие в легкости гидролиза амидных групп. Изучение гидролиза модельных карбоновых кислот циклопентанов, представляющих конформационные детали витамина B₁₂, показало, что, по-видимому, скорость гидролиза в основном определяется стерическими факторами [11]. В первую очередь гидролизуются пропионамидные группы b, d и e (формула XIX), которые не имеют соседних метильных групп и поэтому являются наиболее лабильными. Но из этих трех групп одна выделяется своей активностью. Многие экспериментальные результаты можно объяснить только, если принять, что первой образуется монокарбоновая кислота e. Как показывает рентгеноструктурный анализ, только положение e вследствие своего пространственного окружения может находиться во взаимодействии с фосфатной группой. Кислота e в водном растворе слабо гидролизует, отщепляя нуклеотид, в то время как изомерные моно-кислоты не изменяются. При стоянии раствора кобинамид-(VI)-фосфата при комнатной температуре в темноте образуется единственная карбоновая кислота, дефосфорилирование которой приводит к abcdg-пентамиду кобиновой кислоты (V). Рентгеноструктурным анализом и методом дифракции нейтронов было доказано, что, действительно, первой при гидролизе образуется монокарбоновая кислота e (XIX), причем в этом соединении фосфатная группа не заряжена, а пропионовая группа кольца C существует в виде пропионат-иона [14, 15].

Пропионамидная группа f хотя и имеет только γ-метильный заместитель, но замещение в амиде оказывает допол-



XIX

нительное стерическое влияние, поэтому гидролиз группы f затруднен и образующиеся при гидролизе витамина B₁₂ монокарбоновые и дикарбоновые кислоты все содержат нуклеотид. Для уточнения вопроса о гидролизе группы f проведен гидролиз кобинамида (VI), кобиновой кислоты (V) и кобамида (VIII). Оказалось, что количество вещества, свободного от аминпропанола, в отдельных кислых фракциях не зависит от длительности гидролиза, но с увеличением числа свободных карбоксильных групп постепенно возрастает. Отсюда следует, что омыление группы f (формула XIX) в небольшой степени наступает очень скоро, но затягивается на время течения всего гидролиза до последней фазы. Вероятно, гидролиз группы g конкурирует с гидролизом группы f. Гидролиз группы f, т. е. превращение витамина B₁₂ в кобировую кислоту (IV), удалось осуществить при действии концентрированной соляной кислоты в строго определенных условиях [16]. Одинаковый ход гидролиза оксикобаламина и кобинамида (VI) предполагает, что нуклеотид не оказывает сильного эффекта на течение кислого гидролиза. Более жесткая кислая обработка приводит к смеси пента-, гекса- и гептакарбоновой кислот, не содержащих нуклеотида, причем ацетамидные группы а и с (формула XIX), имеющие β-метильные заместители, гидролизуются медленнее, чем группа g.

При щелочном гидролизе кобаламина в присутствии воздуха образуются дикарбоновые кислоты, которые являются производными дегидровитамина, т. е. содержат лактам у кольца В. В инертной атмосфере в щелочных условиях образуются те же кислоты, что и при кислом гидролизе, однако нуклеотидсодержащие моноосновные

кислоты хроматографически отличаются от соответствующих кислот, полученных при кислотом гидролизе [17]. Сходство ультрафиолетовых спектров всех кислот указывает, что хромофор остается незатронутым.

При нагревании кобаламина с этанолом в присутствии сильных кислот образуется гептаэтиловый эфир кобириновой кислоты, который при обработке избытком йодистого метилмагния превращается в соответствующий гепта-третичный спирт [6].

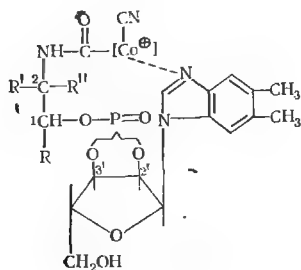
Амидирование моно-, ди- и трикарбоновых кислот приводит к витамину В₁₂. При реакции промежуточного смешанного ангидрида с различными замещенными аминами образуются замещенные амиды, некоторые из них являются антагонистами витамина В₁₂ [11]. Свободные кислоты либо неактивны, либо также являются антагонистами В₁₂ по тесту с *E. coli* [18, 19].

Все 3 монокарбоновые кислоты, полученные при кислотом гидролизе, являются антагонистами В₁₂ относительно *E. coli*, но они отличаются по своей микробиологической и гематологической активности, т. е. отдельные амидные группы имеют различное биохимическое значение [20]. Самым сильным антагонистом является кислота е, а также метиламид и гидразид этой кислоты [21].

Аналог ДБК-кофермента, содержащий свободную карбоксильную группу, получен при мягком кислотом гидролизе [13]. Были получены и следующие амиды этой кислоты: метиламид, этиламид, анилид и 2,4-динитроанилид. По аналогии со строением монокарбоновой кислоты цианкобаламина предположили, что и в случае гидролиза кофермента это кислота е (формула XIX). Это подтверждается тем, что при цианолизе получают кобаламин, идентичный хроматографически кислоте е. Аналог кобамидного кофермента со свободной карбоксильной группой не проявляет ни активности, ни ингибиторных свойств в системе рибонуклеотид-редуктазы, в то время как анилид этой кислоты и ее динитроанилид активны [13]. По-видимому, свободная кислота не может связываться с апоферментом (из-за отрицательно заряженного карбоксилат-иона). Поскольку этиламид кислоты е цианкобаламина успешно конкурирует с витамином В₁₂ при всасывании в кишечнике, можно заключить, что у антагониста не изменены те части структуры, которые служат для связывания с ферментом, и что антагонизм обусловлен видоизменением функциональной в биохимическом отношении амидной группы [22]. В пользу

этого вывода говорят и данные о том, что антагонист проявляет свое действие путем замещения витамина В₁₂ в соответствующей ферментной системе [23, 24].

Группа 2-аминопропанола имеет особое значение для проявления биологической активности [17]. Многие ана-



XX

логи с различными алканоламинными остатками обладают антивитаминой активностью. Они получены взаимодействием аминоканолэфиров α-рибозолфосфорной кислоты со смешанным ангидридом кобириновой кислоты (IV) и этилугольной кислоты [25]. При этом образуется 2 ряда продуктов: содержащие координационно связанный с атомом кобальта нуклеотид и содержащие нуклеотид, не связанный с кобальтом. Эти продукты (формула XX) отличаются лишь тем, что фосфатный остаток связан с 2'-О-рибозы. Различие в свойствах этих веществ определяется тем, что вследствие образования неприродного 2'-фосфата и возникшего из-за этого напряжения координационная связь азота имидазола с кобальтом ослабляется.

Ростовая активность алканоламинных аналогов (XX) испытывалась на *E. coli* и *Ochromonas malhamensis* [25] (табл. 20). Замещение при С-1 алканоламинного остатка (формула XX), если заместитель не очень большой, не сильно понижает воздействие на рост *E. coli*, замещение при С-2 имеет следствием сильное конкурентное ингибирование. Для стимулирования роста *Ochromonas malhamensis* стерическое расположение при С-1 (XXа в, д) не имеет значения. Зато введение метильных групп к С-2 (XXз) значительно уменьшает активность. Введение фенильной и бензильных групп как к С-1 (XXм), так и к С-2 (XXк) полностью подавляет активность этих аналогов. Алканоламинные аналоги с изомерными 2'-фосфатами (XXб, г, ж, и,

Ростовая активность алканоламинных аналогов витамина В₁₂

Соединение	Структура аналогов витамина В ₁₂ (XXa—н)				<i>E. coli</i>	<i>Orchomonas malhamensis</i>
	положение остатка фосфата в риботиде	R	R'	R''		
XXa	3'-0	D-CH ₃	H	H	100	100
XXб	2'-0	D-CH ₃	H	H	2	0,7
XXв	3'-0	L-CH ₃	H	H	60	100
XXг	2'-0	L-CH ₃	H	H	2	0,3
XXд	3'-0	DL-CH ₃	H	H	80	100
XXе	3'-0	H	H	H	83	60
XXж	2'-0	H	H	H	5	0,3
XXз	3'-0	H	L-CH ₃	H	0,1	4
XXи	2'-0	H	L-CH ₃	H	0,1	0,1
XXк	3'-0	H	DL-CH ₂ C ₆ H ₅	H	0,1	0,1
XXл	2'-0	H	DL-CH ₂ C ₆ H ₅	H	0,1	0,1
XXм	3'-0	DL-C ₆ H ₅	H	H	0,01	0,01
XXн	2'-0	DL-C ₆ H ₅	H	H	0,01	0,01

л, н) не имеют активности. По-видимому, структура алканоламинной части молекулы очень важна для связи с белками. Перемещение метильной группы с С-1 к С-2 не ведет к ухудшению связывания с белком, тем не менее ростовая активность аналога исчезает. Структурная специфичность витамина В₁₂ не идентична для различных микроорганизмов и различных ферментативных систем. Структурные вариации могут вести к потере микробиологической активности, но к сохранению витаминных свойств для человека. Несколько примеров: замещение на фенил и бензил при С-1 (XXм) или С-2 (XXк) у алканоламинного остатка вызывает уничтожение ростовой микробиологической активности, в организме человека такой аналог не конкурирует с витамином В₁₂ в обмене веществ; замещение на фенил и бензил и наличие изомерной 2-фосфорибозной связи (XXл, н) ведет к потере микробиологической активности и к нарушению типичного для витамина В₁₂ метаболизма в организме человека. Аналог XXз не имеет ростовой микробиологической активности, в то время как для человека сохраняет свойства витамина.

В настоящее время одним из наиболее активных антагонистов витамина В₁₂ по отношению к росту *E. coli* и *Ochromonas malhamensis* является 3-фосфо-2-метил-2-аминопропанольный аналог витамина В₁₂ (XX, R = H, R' =

$R''=CH_3$), получивший условное обозначение S-102. Синтезированы его светочувствительные Со-алкильные и Со-5'-дезоксиаденозилные формы [26]. Все коферментные аналоги являются более слабыми антагонистами витамина B_{12} в тесте на *E. coli*, чем цианид аналога S-102, который на 50% тормозит рост при молярных соотношениях 3:1. С увеличением длины цепи алкина активность уменьшается от 3:1 (CN) до 5:1 (CH_3), 140:1 (C_2H_5) и 180:1 (C_3H_7). Со-этиламинный аналог S-102 и Со-аллильный аналог S-102 более сильные антагонисты, чем этильный и пропильный аналоги S-102. Ингибиторная активность изопропилиден-5'-дезоксиаденозил-S-102 (7:1) может быть увеличена; после снятия изопропилиденовой группы активность 5'-дезоксиаденозил-S-102 близка к активности циан-S-102. При испытании этих аналогов на *Qchromonas malhamensis* сохраняются те же закономерности (табл. 21). Свойства этих веществ на ферментативном уровне изучены на системе диолдегидратазы. Цианкобаламин и циан-форма S-102 оказались одинаково сильными ингибиторами кобамидзависимой реакции диолдегидратазы. Все Со-С-аналоги S-102 более сильные антагонисты ДБК-кофермента, чем циан-форма S-102. Сами по себе эти аналоги S-102 неактивны и не заменяют ДБК-кофермента в диолдегидратазной реакции.

Таблица 21

Ингибиторная активность Со-С-аналогов коррина S-102

Тип S-102	Отношение молярных концентраций ингибитор—витамина B_{12} при 50% торможении роста	
	<i>E. coli</i> 113-3	<i>Orchomonas malhamensis</i>
Со-CN	3:1	30:1
Со- CH_3	5:1	30:1
Со- CH_2CH_3	140:1	60:1
Со- $CH_2CH_2CH_3$	180:1	250:1
Со- $CH_2CH_2NH_2$	14:1	580:1
Со- $CH_2CH=CH_2$	30:1	50:1
Изопропилиден- C_5' -дезоксиаденозил	7:1	180:1
C_5' -дезоксиаденозил	4:1	30:1

Для выяснения возможного механизма действия аналогов S-102 на микроорганизмы и на ферментативном

уровне проведены опыты с цианкобаламином, содержащим меченый кобальт. Оказалось, что даже малые концентрации S-102 вызывают 50% уменьшение поглощения меченого цианкобаламина покоящимися клетками *E. coli*; в то время как изомеры с 3'- и 2'-фосфорибозой DL-2-бензил-2-аминоэтанольного аналога (XXк, л) даже при высокой концентрации не влияют на его поглощение. По-видимому, некоторые аналоги, например бензильный (XXк), не конкурируют с цианкобаламином при поглощении покоящимися клетками *E. coli*, в то же время, S-102 способен абсорбироваться клетками *E. coli* в той же степени, что и цианкобаламин. Со-С-алкильные аналоги алканоламинного типа также включаются в клетки *E. coli*.

Имеются 2 предположения о причинах различий в ингибировании роста микроорганизмов алкильными аналогами S-102. Во-первых, возможно, что они сами по себе неактивны в качестве антагонистов витамина B₁₂ и становятся активными только после расщепления Со-С-связи, т. е. различное торможение является результатом различия в стабильности Со-С-связи при ферментативном или самопроизвольном расщеплении внутри клеток микроорганизмов. Во-вторых, возможно, что они не расщепляются внутри клеток и конкурируют в своей первоначальной химической форме при связывании с апоферментом. В таком случае различная степень торможения роста отражает структурную специфичность при конкурировании алкильных аналогов S-102 с ДБК-коферментом в этих микроорганизмах.

Механизм действия алкильных аналогов S-102 в кобамид-зависимой реакции диолдегидратазы характеризуется структурной неспецифичностью, вероятно, из-за одинакового сродства всех форм S-102 к апоферменту. Алкильные производные S-102 проявляют большую конкурентную ингибиторную активность в реакции диолдегидратазы, чем алкильные аналоги ДБК-кофермента, однако вследствие структурной неспецифичности нельзя сделать какие-либо выводы о механизме их действия.

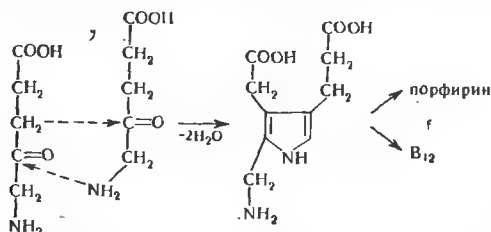
Одним из наиболее сильных антагонистов витамина B₁₂ оказался корриноид, не содержащий атома кобальта. Атом кобальта в природных или синтетических корриновых системах не выделяется при жестком гидролизе и не обменивается с солями радиоактивного кобальта, так как он участвует в сопряженной системе коррина [27, 28, 29]. В противоположность этому цинковый комплекс коррина

очень лабилен и выделяет металл в кислой среде при комнатной температуре, давая хлоргидрат свободного основания [30]. В микробиологических условиях атом кобальта корриновых комплексов легко обменивается с радиоактивными солями. Так, в присутствии дицианида кобировой кислоты и меченого нитрата кобальта *P. chermanii* образуют радиоактивную дикарбоновую кислоту, идентичную кислоте, образующейся при гидролизе кобировой кислоты [31]. В 1965 г. из клеток фотосинтезирующих бактерий *Chromatium* был выделен коррин, не содержащий кобальта [30]. Это оказался дезкобальткобамид. Он реагирует необратимо с кобальтом, давая кобамид. Позднее были выделены дополнительно дезкобальткобинамид и нейтральный бескобальтовый корриноид неуставленного строения [33]. Эти корриноиды превращаются в желтый продукт неизвестной структуры при действии света, щелочи и кислоты. Они поглощают кобальт в слабощелочных растворах. Свободные от кобальта корриноиды являются наиболее сильными конкурирующими антагонистами витамина B₁₂ относительно *E. coli* [34]. Ростовая активность дезкобальткобамида и кобинамида в отсутствие витамина B₁₂ меньше 0,01% (за 100% принята активность B₁₂). Антагонистическое действие свободных корриноидов неодинаково для различных микроорганизмов; эффект этих веществ больше, если их прибавляют одновременно с цианкобаламином, а не после. Антивитаминный эффект бескобальтовых корриноидов исчезает при превращении их в желтый продукт. Прибавление кобальтовых солей к среде с бескобальтовыми корриноидами не ведет к образованию активного комплекса. Это можно объяснить либо невозможностью проникновения ионов кобальта в клетки микроорганизмов, либо отсутствием ферментов в этих организмах для введения кобальта в кольцо коррина. Предполагают, что бескобальтовые корриноиды блокируют места связывания витамина B₁₂ и что атом кобальта не необходим при этом.

Бескобальтовый корриноид был выделен также из нефотосинтезирующих микроорганизмов *Streptomyces olivaceus* 605 [35]. Это соединение имеет спектры УФ-, КД- и флюоресценции, аналогичные спектрам корриноида, выделенного из *Chromatium*, однако проявляет более кислый характер при электрофорезе на бумаге, что позволило предположить, что он имеет одну свободную карбоксильную группу в боковой цепи и, следовательно, является продуктом более ранней стадии биосинтеза корриноида. Эта беско-

бальтовая корриноидная кислота образуется только при выращивании *Streptomyces olivaceus* 605 на бескобальтовой среде; ввести кобальт в выделенную кислоту не удалось.

Таким образом, все известные структурные изменения корринового кольца или его боковых цепей вызывают изменение биохимического поведения аналогов V_{12} . Для выяснения биохимических функций отдельных частей коррина большое значение имеет изучение биогенеза витамина V_{12} . Расположение β -заместителей свидетельствует о наличии общих моментов в биосинтезе порфиринов и корринов.



Меченная в различные положения δ -аминолевулиновая кислота (предшественник порфирина) дает меченый V_{12} , в котором расположение радиоактивных углеродных атомов свидетельствует об аналогичном течении начальных стадий синтеза порфирина и коррина [36]. Опыты с меченым метионином показали, что «экстра»-метильные группы появляются при биохимическом метилировании с участием метионина. Стадия, на которой происходит метилирование, неизвестна. С помощью δ -аминолевулиновой кислоты-5- C^{14} доказано, что α -метильная группа у кольца A не появляется при метилировании, а имеет тот же источник, что и мостиковые C-атомы. Предполагают, что δ -аминолевулиновая кислота дает порфобилиноген, который конденсируется в тетрапиррольную систему, и последняя является общим предшественником порфирина и коррина. Циклизация этой системы может приводить к порфируну или в присутствии кобальта после восстановления к коррину [37]. Однако выделение бескобальтовых корриноидов свидетельствует о том, что, по-видимому, кобальт может внедряться в ядро коррина и на более поздних стадиях.

В заключение следует отметить, что химические свойства корриновых систем изучены очень мало, а систематических исследований влияния модификаций коррина и его боковых цепей на активность кобамидного кофермента вообще не

предприималось. Однако отдельные данные, приведенные выше, указывают, что изучение этой области представляет большой интерес как с химической, так и с биохимической точки зрения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Biochim. Biophys. Acta, 1966, 117, 285.
2. Hill I., Pratt I., Williams R. J. Teor. Biol., 1962, 3, 423.
3. Johnson A., Dolphin D., Rodrigo R. J. Chem. Soc., 1964, 3186.
4. Dolphin D., Johnson A., Rodrigo R. Ann. N. Y. Acad., 1964, 112, 590.
5. Bonnett R., Cannon J., Clark V., Johnson A., Parker L., Smith E., Todd A. J. Chem. Soc., 1957, 1158.
6. Wagner F., Bernhauer K. Ann. N. Y. Acad., 1964, 112, 580.
7. Wagner F. Proc. Royal Soc. A, 1965, 288, 344.
8. Смит Л. Витамин В₁₂. М., 1962.
9. Parker L., Smith L., Stafford W., Todd A. Tetrahedron Letters, 1963, 259.
10. Tamao J., Morikawa J., Shimizu S., Fukui S. Biochem. Biophys. Research. Comm., 1967, 28, 692.
11. Bonnett R., Raleigh J., Redman D. J. Am. Chem. Soc., 1965, 87, 1600.
12. Bernhauer K., Wagner F., Beisbarth H., Rietz R., Vogelmann H. Biochem. Z., 1966, 344, 289.
13. Morley C., Blakley R., Hogenkamp H. Biochemistry, 1968, 7, 1231.
14. Nockolds C., Ramaseshan S., Waters T., Waters J., Hodgkin D. Nature, 1967, 214, 129.
15. Moore F., Willis B., Hodgkin D. Nature, 1967, 214, 130.
16. Bonnett R., Godfrey I., Redman D. J. Chem. Soc. C, 1969, 11.
17. Bonnett R., Cannon J., Johnson A., Todd A. J. Chem. Soc., 1957, 1148.
18. Smith E., Parker L., Gant D. Biochem. J., 1956, 62, 14P.
19. Bernhauer K., Muller O., Wagner F. Angew. Chem., 1963, 75, 1145.
20. Csanyi E., Kelemen A., Borsy J. Nature, 1962, 194, 689.
21. Kelemen A., Csanyi E., Simon A. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 1962, 21, 177.
22. Latner A., Raine L. Nature, 1957, 180, 1197.
23. Wagle S., Mehta R., Johnson B. Arch. Biochem., 1957, 72, 241.
24. Wagle S., Mehta R., Johnson B. Biochim. Biophys. Acta, 1958, 28, 215.
25. Friedrich W., Heinrich H. Biochem. Z., 1961, 333, 554.
26. Friedrich W., Heinrich H., Konigk E., Schulze P. Ann. N. Y. Acad., 1964, 112, 601.
27. Bertele E., Boos H. et al. Angew. Chem., 1964, 76, 393.
28. Boos R., Robenblum C., Woodbury D. J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 5446.
29. Baldwin R., Lowry J., Harrington R. J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 4968.
30. Fischli A., Eschenmoser A. Angew. Chem., 1967, 79, 865.
31. Friedrich W., Sandeck W. Biochem. Z., 1967, 340, 465.
32. Toohey J. Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1965, 54, 934.
33. Toohey J. Fed. Proc., 1966, 25, 1628.
34. Perlman D., Toohey J. Nature, 1966, 212, 300.

35. Sato K., Shimizu S., Fukui S. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1970, 39, 170.
36. Shemin D., Bray R. Ann. N.Y. Acad., 1964, 112, 615.
37. Dicker I., Dolphin D., Grigg R., Johnson A. Chem. Comm., 1967, 560.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ДЕЙСТВИЯ КОБАМИДНОГО КОФЕРМЕНТА

И. П. РУДАКОВА, А. М. ЮРКЕВИЧ

Всесоюзный научно-исследовательский витаминный
институт, Москва

Кобамидный кофермент был открыт Barker и др. в 1958 г. при изучении ферментативного превращения глутаминовой кислоты в β -метиласпарагиновую [1]. В печени и других органах человека и животных витамин B_{12} всегда находили в форме кобамидного кофермента — ДБК-кофермента [2]. Метилкобаламин и ДБК-кофермент были первыми металло-органическими соединениями, содержащими σ -Co-C-связи, выделенными из природных источников. Эти соединения во многих отношениях отличались от традиционных комплексных соединений трехвалентного кобальта. В связи с этим проблема их исследования включает определение реального валентного состояния атома кобальта, изучение реакционной способности кобальта, выяснение роли групп, замещающих *транс*-аксиальные лиганды и их влияния на свойства корриновой системы, а также на другие *транс*-аксиальные лиганды и на атом кобальта. Исследование химических и физико-химических свойств кобамидного кофермента является основой для понимания механизма действия B_{12} -зависимых ферментов.

Детальный рентгеноструктурный анализ кофермента, который проводили в Оксфорде в течение 8 лет, позволил установить строение и конформацию сложной молекулы (рис. 72) [3]. Рассматривая структуру ДБК-кофермента, можно выделить следующие четыре главные области: центральный атом кобальта (А), плоскостной тетрадендатный лиганд — корриновый макроцикл (Б) и два *транс*-аксиальных лиганда (В и Г).

На рис. 72 представлена структура ДБК-кофермента, полученная на основании рентгеноструктурного анализа. Согласно этим данным, корриновое кольцо (Б) не является плоским, в макроцикле резко выражено напряжение. Адениновый остаток нуклеозида В расположен параллельно корриновому кольцу, в то время как сахарная часть

лежит в плоскости, проходящей приблизительно под прямым углом к корриновому кольцу. Дезоксиаденозил-гликозидная связь имеет β -конфигурацию. Интересно отметить, что 5'-дезоксаденозильный лиганд в молекуле кобамидно-

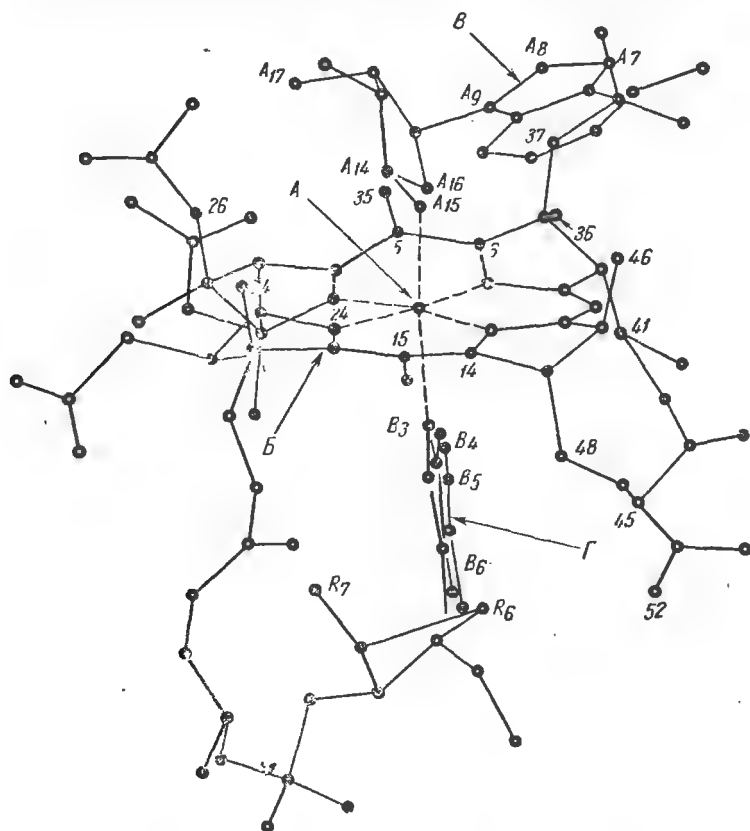


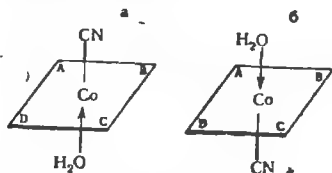
Рис. 72. Структура ДБК-кофермента, полученная на основании данных рентгеноструктурного анализа.

го кофермента занимает фиксированное положение относительно корринового ядра: $\text{Co}-\text{C}_{5'}$ -связь окружена двумя метильными группами (C-46 и C-54) и двумя метиленовыми группами (C-26 и C-37); таким образом, эти группы и сам аденозильный остаток как бы экранируют металлоорганическую связь. Адениновый агликон расположен частично над кольцом С, и такое положение стабилизирует

внутримолекулярные контакты аденозильной группы с коррином. Ввиду этого свободное вращение «верхнего» лиганда вокруг Со-С-связи в растворе кажется маловероятным; можно предположить, что в растворе существует такая же конформация молекулы кобамидного кофермента. Длина Со-С-связи в коферменте значительно больше (2,05 Å), чем длина Со-цианидной связи (1,92 Å) в цианкорриноидах. Таким образом, введение 5'-дезоксиаденозильного остатка вместо CN-группы приводит к ослаблению Со-С-связи. Длины Со-N-связей в коферменте больше, чем в цианкобаламине, что также коррелирует с замещением цианида дезоксиинуклеозидным остатком в аксиальном положении. Связь Со-N-бензимидазола (2,23 Å) тоже длиннее, чем соответствующая связь в цианкобаламине (2,02 Å). Такое увеличение этой связи на 0,21 Å в коферменте согласуется с величиной pK_a протонирования бензимидазола, которая для кофермента составляет 3,5, в то время как pK_a для цианкобаламина — 0,1 [4]. Lenthert высказал предположение, что удлинение этой связи обусловлено изменением в характеристических зарядах другого аксиального лиганда в большей степени, чем простыми геометрическими факторами [3, 5]. Следует отметить, что во всех природных кобаламинах в нуклеотидной части содержатся всегда α -аномеры рибитидов. Изучение свойств синтетического β -(5,6-диметилбензимидазолил)кобамидцианида неожиданно показало, что в этом аналоге связь Со-N-бензимидазола намного устойчивее, чем в цианкобаламине, и азот бензимидазола не протонируется [6]. Таким образом, из данных рентгеноструктурного анализа кобамидного кофермента следует, что «нижнее» аксиальное положение молекулы кофермента наиболее открыто для подхода субстрата в ферментативной реакции или же для связывания с апоферментом и образованием кофермент-апоферментного комплекса за счет возможного разрыва достаточно лабильной связи с бензимидазолом. В то же время Со-С_{5'}-связь сильно экранирована за счет сильных внутри- и межмолекулярных взаимодействий, так что подход к этой связи субстрата стерически более специфичен.

В ряду корринов недавно открыт новый тип координационной изомерии, включающей изомерию положения *транс*-аксиальных лигандов. Вначале этот тип стереоизомерии был обнаружен на примере аквацианкобинамида (фактора В) и аквацианкобиновой кислоты (фактора V_{1a}) [7, 8]. На схеме плоскость квадрата — корриновый макро-

цикл — изображены стереоизомеры аквацианкобинамида, обозначенные буквами а и б.



Fridrich наблюдал изомеризацию «а» и «б»-изомеров и установил, что она облегчается при нагревании, действии анионов (например, цианид-иона и ацетат-иона) окиси углерода и света [7, 9]. При этом установлено, что в области рН 2,5—4,5 происходит изменение положения равновесия: в кислой области имеется 50%, а в нейтральной — 20% «б»-формы. Недавно этот тип координационной «а»—«б»-изомерии, включающей изменение конфигурации у атома кобальта, установлен на примере метилкобаламина, что противоречит более ранним предположениям об отсутствии такой изомерии в ряду кобаламинов [10, 11].

До настоящего времени возможность участия координационных изомеров в биохимических превращениях не рассматривалась. Это, однако, не означает, что подобного рода изомеризационные процессы не могут иметь места при биокаталитическом акте. Возможность образования σ -Co-C-связи в «нижнем» аксиальном положении, которая до сих пор не учитывалась, допускает новые предположения о характере контакта кофермента с субстратом.

Значение пространственных факторов для проявления тонких различий в реакционной способности различных корринов отчетливо выявляется при исследовании реакций алкилирования Co^{I} -корринов пространственно затрудненными вторичными алкилгалогенидами. Оказалось, что, например, при действии на витамин $\text{B}_{12\text{s}}$ бромистого циклогексила образуется малоустойчивый циклогексилкобаламин [12]. Алкилирование Co^{I} -производного 3,5,6-триметилбензимидазолилкобамида, «нижний» лиганд которого не связан с кобальтом, напротив, привело к образованию устойчивого алкилкобаламина [13]. Эти результаты интерпретированы следующим образом: диметилбензимидазольный лиганд в «нижнем» аксиальном положении молекулы витамина B_{12} втягивает атом кобальта в плоскость корринового кольца и таким образом стерически препятст-

бывает реакции с вторичными алкилгалогенидами. В против-
воположность этому в Co^{I} -кобинамиде отсутствует сильный
лиганд в «нижнем» аксиальном положении, и атом кобаль-
та расположен над плоскостью корринового кольца так,
что он может быть алкилирован объемным заместителем.

Таким образом, рассмотрение структурных деталей ко-
баламинов и кобамидного кофермента позволяет сделать
ряд предположений, которые могут явиться исходными
пунктами для понимания их биохимических функций. К ним
относится прежде всего представление о неравноценности
направлений в структуре кофермента, где наблюдают дос-
таточно жесткий корриновый макроцикл и легко замещаю-
щиеся *транс*-аксиальные лиганды. Различают влияние ак-
сиального лиганда на физические и химические свойства
коррина, названное *цис*-эффектом, и влияние на другой
транс-аксиальный лиганд, названное *транс*-эффектом.

Для того чтобы определить влияние различных *транс*-
аксиальных лигандов как на корриновую систему, так и на
молекулу кофермента в целом было синтезировано и иссле-
довано большое число производных кобамида общей форму-

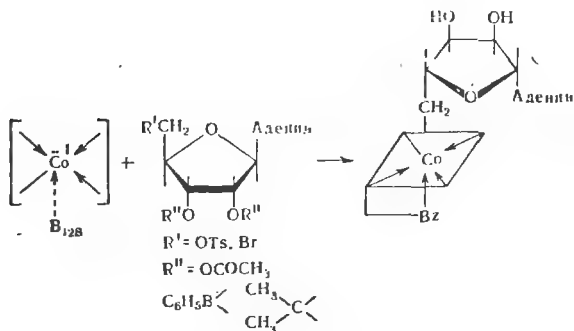
$$\begin{array}{c} \text{X} \\ | \\ \text{[Co]} \\ | \\ \text{Y} \end{array}$$

лы [Co]. В этих комплексах особый интерес представля-

ли такие производные, у которых X были углеродными
лигандами [14]. Синтезированные соединения относились
к ряду кобаламинов, если Y был бензимидазольным лиган-
дом. В растворе кислоты этот лиганд может быть прото-
нирован и в этом случае $\text{Y} = \text{H}_2\text{O}$ (см. стр. 316). Синтезиро-
ваны и изучены кобаламины, где X: H_2O , OH^- , Cl^- , Br^- ,
 I^- , OCN^- , SCN^- , SeCN^- , NO_2^- , SO_3^{2-} , RNC , NH_3 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$,
 RS^- , C_2H^- , C_2H_5^- , *n*- C_3H_7^- , *изо*- C_3H_7^- , *n*- C_4H_9^- , *изо*-
 C_4H_9^- . Синтезированы также комплексы, где X имели те
же значения, а $\text{Y} = \text{H}_2\text{O}$, OH^- , CN^- . Частичный синтез коба-
мидного кофермента был осуществлен восстановлением
циан- или оксикобаламина боргидридом натрия или каким-
либо другим восстановителем до витамина $\text{B}_{12\text{a}}$ и после-
дующим его алкилированием 5'-производными аденозина.

В синтезе ДБК-кофермента в качестве алкилирующих
агентов нашли применение 5'-О-тозил-2',3'-изопропилиден-
аденозин [15], 5'-О-тозил-2',3'-ди-О-ацетиладенозин [16], 5'-
О-тозил-2',3'-фенилборонат аденозина [17], 5'-дезоксид-
5'-йодаденозин. Развитие синтетических методов исследо-
ваний в области Co-C-производных кобаламинов, а

Также аналогично построенных других хелатных соединений, содержащих кобальт, позволило последовательно изучить широкий ряд аналогов кобамидного кофермента. Во всех этих соединениях валентное состояние кобальта формально принимается равным трем.



Затем были исследованы физико-химические свойства этих комплексов; электронные спектры (в видимой и УФ-области), ИК-спектры, кривые кругового дихроизма, ЭПР-и ЯМР-спектры. Одновременно были изучены химические равновесия, в которых обменивались как «верхние» — X-лиганды, так и «нижние» — Y-лиганды. На рис. 73, а, б, в, г представлены четыре типа спектров поглощения кобаламинов. Если рассмотреть последовательно спектры кобаламинов с изменяющимся «верхним» лигандом X в такой последовательности: Cl^- , Br^- , I^- , OCN^- , SCN^- , SeCN^- , C_2H^- , C_2H_3^- , C_2H_5^- , то они дают последовательно 4 указанных типа спектра. Этот ряд соответствует нефелоауксетическому (спектрохимическому) ряду. Таким образом, можно утверждать, что увеличение электронной плотности на кобальте, вызванное σ -эффектом лиганда X, вызывает изменение в спектре корринового хромофора. Электроотрицательность атома углерода, присоединенного к атому кобальта, уменьшается в последовательности: цианид > этинил > винил > метил > 5'-дезоксаденозил, что отражается на положении полос поглощения в спектре кобаламинов [18]. Так, γ_1 -полоса, соответствующая 7π - 9π переходу в корриновом кольце, при этом смещается в более длинноволновую область и падает в интенсивности, в то время как другие полосы поглощения растут в интенсивности и смещаются в коротковолновую область [19, 20]. Цианко-

баламин и кобамидный кофермент представляют собой концевые члены серии корриноидов, в которой спектр постепенно изменяется и полоса поглощения в области 375 нм в спектре кобамидного кофермента, вероятно, родственна интенсивной γ_1 -полосе (361 нм) в спектре цианкобаламина [18]. Все эти данные свидетельствуют о существовании

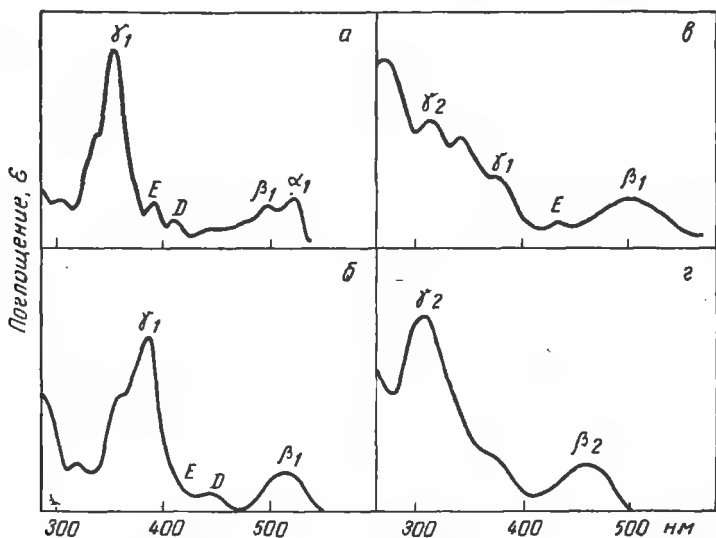
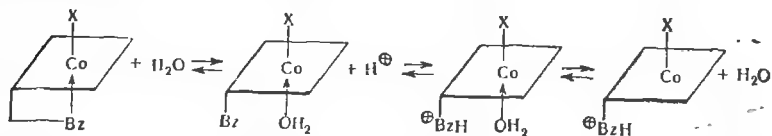


Рис. 73. Спектры поглощения различных корриновых соединений.

цис-эффекта, т. е. передачи влияния аксиального лиганда через кобальт на корриновое кольцо. Указанный эффект необходимо учитывать при интерпретации ферментативных опытов с аналогами кобамидного кофермента. Изменения в спектре кобаламинов столь велики, что первоначально считали сопряженную корриновую систему химически модифицированной. Однако данные о кристаллической структуре, которые теперь известны, исключают такую возможность, и необходимо объяснить эти наблюдаемые изменения в рамках электронных или конформационных изменений корринового макроцикла. По предположению авторов работы [18], спектры а и г были соотнесены с 6- и 5-координационными комплексами. В то время, как слабые электронодонорные лиганды X дают 6-координационные комплексы, например цианкобаламин, Со-С-алкильные произ-

водные, например метилкобаламин, дают 5-координационные комплексы. Таким образом, природа химических изменений (и изменения электронных спектров) хорошо объясняется переходом от 6- к 5-координационным комплексам. Переходы от одного типа соединений к другому иллюстрируются следующей схемой.



На этой схеме последняя стадия — потеря молекулы воды и образование 5-координационного комплекса является экстремальным примером *транс*-влияния лиганда X. Впрочем, альтернативное утверждение может заключаться в том, что «нижний» аксиальный лиганд удален от кобальта на необычно большое расстояние. Даже в более простых комплексах невозможно определить, какая из этих двух возможностей реализуется в растворе. Тем не менее существуют факты, свидетельствующие в пользу предположения о 5-координационной природе корринов. Оказалось, например, что дегидратация кобамида ($\text{X}=\text{C}_2\text{H}_5$, $\text{Y}=\text{H}_2\text{O}$) приводит к аналогичным изменениям спектра твердого комплекса. Показано также, что гидратация этого соединения дает обратный переход. Совершенно сходный ряд изменений спектров можно увидеть у метилкобаламина и ДБК-кофермента. Исследование спектров этих соединений при различных температурах подтверждает предположение, что бензимидазольный лиганд освобождается от координации с атомом кобальта при повышении температуры с образованием 5-координационного комплекса [21]. В случае ДБК-кофермента выяснилось, что он в водном растворе является смесью 5- и 6-координационных комплексов. При этом 6-координационные комплексы сами существуют в двух формах (с координированным бензимидазолом или с водой). Очень важным оказалось то обстоятельство, что скорость перехода между двумя формами ($6 \rightleftharpoons 5$) очень велика, так что в этом отношении молекула кофермента существенно отличается от типичных неорганических комплексов трехвалентного кобальта, обменивающих лиганды только очень медленно. Важно также отметить сходство спектров низкоспиновых Co^{II} - и Ni^{II} -корриновых комплексов со спектром

кобамида с координационным числом 5, формально содержащего трехвалентный кобальт. Подобные наблюдения позволили Hill, Pratt высказать предположение о том, что связывание алкильного лиганда с Co^{III} , очевидно, вызывает такие изменения электронного состояния и геометрии как центрального иона металла, так и корринового макроцикла, которые приводят к состоянию, нормально существующему в низко-спиновых кобальтовых комплексах с Co^{II} [14]. Хотя этот результат теоретически полностью не может быть интерпретирован, он имеет очень важное значение для понимания химической реакционной способности ДБК-кофермента, так как обычно принимается, что 5-координационный Co^{III} участвует, как промежуточный продукт, при $\text{S}_{\text{N}}1$ -реакциях октаэдрических комплексов. Таким образом, кобамидный кофермент в нормальных условиях может существовать в форме, обычно принимаемой для переходного состояния при реакциях классических комплексов Co^{III} . Vallee, Williams назвали подобные аномальные состояния комплексов «энзиматическими состояниями» [22].

Дальнейшим этапом исследований свойств ДБК-кофермента явилось изучение кривых кругового дихроизма (КД) кофермента и его аналогов. Хотя однозначной интерпретации кривых КД еще не существует, изучение спектров КД различных корриновых соединений показывает, что имеется параллель между кривыми КД и ультрафиолетовыми спектрами. Особенно важным оказалось свойство кривых КД претерпевать инверсию при замещении *транс*-аксиальных лигандов X и Y, в то время как на ультрафиолетовые спектры такое замещение оказывает небольшое влияние. Интересными оказались результаты, полученные нами при исследовании кривых КД 5'-дезоксинуклеозидных аналогов ДБК-кофермента. В этом случае оказалось, что при 300—600 нм кривые КД-кофермента и аналогов практически идентичны, а в области 230—300 нм в некоторых случаях наблюдается большое различие. Pratt, Hill исследовали также температурную инверсию кривых КД в спектре производных витамина B_{12} , которая была интерпретирована как следствие изменения конформации, а не координации. Эти результаты безусловно необходимо учитывать в сравнительном изучении кривых КД B_{12} -зависимых ферментов.

Структурная неэквивалентность координационных мест в кобамидах дает необычные преимущества в исследовании как *цис*-, так и *транс*-эффектов. Корриновый цикл исклю-

чает планарные замещения, даже изменения в положении атомов азота корринового макроцикла могут быть только очень незначительными. Такая стереохимическая четкость в целом и в каждом из 6 положений октаэдрического комплекса редко встречалась при исследованиях классических комплексов трехвалентного кобальта. Между тем, рассматривая варианты химических моделей связывания ДБК-кофермента с белком, нельзя не учитывать эффекты, в том числе и *транс*-эффекты, которые могут быть результатом координации атома кобальта кофермента с боковыми группами белка и способны оказывать решающее влияние на реакционную способность Co-C-связи *транс*-аксиального 5'-дезоксинуклеозидного лиганда.

Эффекты *транс*-влияния на модельных кобаламинах были изучены методом инфракрасной спектроскопии. При изучении влияния изменения природы аксиального лиганда на частоты колебания цианида, координированного в *транс*-положении, установлено, что с увеличением поляризуемости аксиального лиганда в последовательности этинил>винил>метил>5'-дезоксиаденозил>этил наблюдается снижение частоты валентного колебания *транс*-цианида от 2110 до 2082 см⁻¹, которое близко к частоте (2078 см⁻¹), найденной в свободном цианиде (табл. 22) [23].

Т а б л и ц а 22

Спектральные характеристики производных кобамида
X-[Co]CN

Аксиальный лиганд (X)	$\nu_{C=N}$ (см ⁻¹)	λ макс (нм) γ_1 -полосы
H ₂ O		353
Bz	2132	361
HO-	2130	—
CN-	2119	367
HC $\equiv$ C-	2110	373
H ₂ C = CH-	2093	386
CH ₃ -	2088	388
5'-Дезоксиаденозил-	2091	—
CH ₃ CH ₂ -	2082	391

Для сравнения в таблице приведены значения γ_1 -полос в ультрафиолетовых спектрах рассматриваемых соединений. Это сравнение показывает, что имеется корреляция между *цис*-эффектом — батохромным сдвигом γ_1 -полосы в

спектрах поглощения и *транс*-эффектом — изменением частот валентных колебаний C-N-группы в инфракрасных спектрах. Эти изменения свидетельствуют, что как только аксиальный лиганд в этой последовательности становится более поляризованным, длина *транс*-металл-лигандной связи возрастает и, следовательно, эта связь становится более ионной [23]. В то же время уменьшение электронодонорных свойств аксиального лиганда X в последовательности $Bz > OH^- > CN^-$ приводит к уменьшению частот валентных колебаний *транс*-цианидной группы, что соответствует ослаблению связи цианида с металлом. Очень простые соотношения между частотами валентных колебаний $C \equiv N$ группы в инфракрасных спектрах и спектрами поглощения указывают, что имеется общая причина этих изменений, заключающаяся в понижении заряда на атоме кобальта за счет изменения σ -донорной способности лиганда X [14]. Изучение характера влияния, которое оказывает на частоту валентного колебания Co-C-связи замещение аксиальных *транс*-лигандов в аналогах метилкобаламина — метилкобалоксимах, показало, что увеличение электронодонорных свойств аксиальных лигандов приводит к увеличению значения частот валентных колебаний Co-C- и Co-N-связей [24]. Таким образом, увеличение нуклеофильности «нижнего» аксиального основного лиганда приводит к упрочнению *транс*-Co-C-связи. Табл. 23 иллюстрирует найденные закономерности.

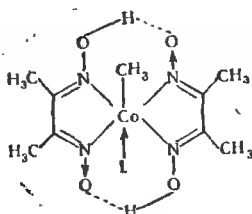
Т а б л и ц а 23

Влияние «нижнего» аксиального лиганда на частоты валентных колебаний Co-C- и Co-N-связей в $CH_3Co[DN]_2$ -комплексах

Лиганд L	Частоты валентных колебаний в инфракрасных спектрах кобалоксимо	
	ν Co-C (см ⁻¹)	ν Co-N (см ⁻¹)
(C ₆ H ₅) ₃ P	331	437, 425
C ₆ H ₅ N	327	432
(CH ₃) ₂ S	325	432
H ₂ O	326	429

Эти данные получены при исследовании последовательности метилкобалоксимо $CH_3Co[DN]_2L$, где $[DN]$ — анион

диметилглиоксима, синтезированных по методу Schrauzer и Windgassen [25].



Другим удобным методом исследования кобаламинов оказалась ЯМР-спектроскопия, так как единственный протон, находящийся при С-10 в корриновом макроцикле, легко был идентифицирован по химическому сдвигу с τ 3,2—4,2. Значения химических сдвигов С-10 водородного атома корринового кольца в большой степени зависят от природы аксиального лиганда. Так с бензимидазолом как фиксированным лигандом в ряду кобаламинов сигнал С-10 протона смещается в сильное поле с изменением аксиальных лигандов в следующем порядке: $\text{H}_2\text{O} < \text{OH}^- < \text{C}_2\text{H}_3^- < \text{CN}^-$ [26]. С водой в качестве фиксированного лиганда сдвиг в сильное поле наблюдается в последовательности $\text{CH}_3^- \sim \text{C}_2\text{H}_5^- < \text{CN}^-$ (табл. 24).

Таблица 24

Корреляция между химическим сдвигом протона при С-10 и энергией первой полосы в электронном спектре

Кобаламин	Химический сдвиг протона при С-10 τ (м.д.)	Волновые числа α -полосы спектра поглощения (10^3 см^{-1})
Днцианкобаламин	4,13	17,2
Этилкобаламин	4,12	18,1
Метилкобаламин	4,12	18,2
Винилкобаламин	4,05	18,2
Оксикобаламин	3,92	18,6
Аквакобаламин	3,72	19,0
Метилкобинамид	3,20	21,7

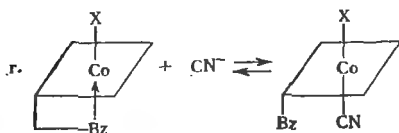
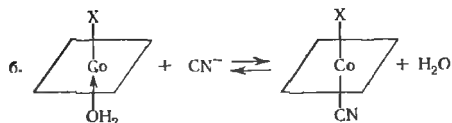
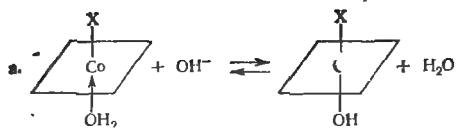
Данные таблицы также свидетельствуют, что изменение σ -донорной способности «верхних» аксиальных лигандов приводит к увеличению электронной плотности коррино-

го цикла, так как при этом наблюдают, во-первых, смещение значений τ в сильное поле, а во-вторых, уменьшение энергии первой полосы (полосы α) в электронном спектре [20]. Метод ЯМР-спектроскопии также позволил определить скорости дейтерообмена протона при C-10 при различных условиях [26]. В оксикобаламине время полуобмена D/H при pH 1,0 составляет около ~ 60 минут, а в метилкобаламине при pH 1,5 оно равно ~ 5 мин. Таким образом, протон при C-10 становится более подвижным, когда кобальт связан с углеродом, это наблюдение свидетельствует, что мезо-положение в корриновом макроцикле также является возможным активным центром молекулы кофермента. В работе Pratt и др. [27] по ЯМР-спектроскопии ДБК-кофермента были сделаны четкие отнесения химических сдвигов для протонов CH_2 -группы в C_5' -положении аденозильного остатка кофермента, что позволяет использовать этот метод для изучения взаимодействия ДБК-кофермента с апоферментом.

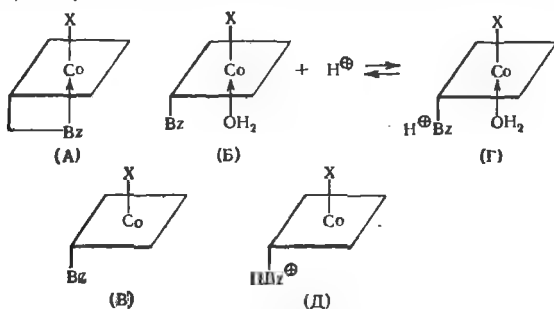
Полярографическое поведение некоторых кобаламинов и кобинамидов представляет дополнительное доказательство того, что природа лигандов, связанных с атомом кобальта с «верхней» и «нижней» стороны корринового кольца значительно влияет на свойства атома кобальта [28]. Увеличение нуклеофильного характера «верхнего» лиганда вызывает сдвиг первой полярографической волны к большим потенциалам.

Оценка влияния аксиальных лигандов в кобаламинах может быть достигнута также исследованием обменных реакций, например определением констант устойчивости при равновесном замещении аксиальных лигандов (так называемый *транс*-эффект). Показано, что константы равновесия, определенные спектрофотометрически для некоторых обменных реакций кобаламинов, в большей степени зависят от природы аксиальных *транс*-лигандов [29, 30]. Примеры равновесий, которые были изучены, представлены на схеме (см. стр. 322).

В каждой из этих реакций слабый σ -донор при атоме кобальта в левой части уравнений замещается на сильный донор электронов в правой части уравнений. Таким образом, константа равновесия определяет акцепторную силу (в льюисовском смысле) атома кобальта. Исследование равновесий позволило установить, что в нейтральном растворе кобаламины существуют в виде смеси трех форм: (А) — бензимидазол координирован, (Б) — бензимидазол свобо-



ден и вода координируется как шестой лиганд и (В) — бензимидазол свободен, т. е. кобальт 5-координационный [31]. При подкислении бензимидазол протонируется, давая комплексы (Д) и (Г).



Величина константы ионизации (K_a) была вычислена из уравнения:

$$\frac{[\text{А}]}{[\text{Б}] + [\text{В}]} = \frac{K_a}{K_n - 1}$$

где K_n — константа диссоциации 1-β-D-5,6-диметилбензимидазола = 10^{-4} .

Из этого уравнения видно, что чем выше значение pK_a кобаламина и чем ближе оно приближается к pK_a свободного бензимидазола, тем выше пропорция форм (Б) и (В) при равновесии в нейтральном растворе за счет ослабления кобальт-бензимидазольной связи. Для кобамидного кофермента вычислено, что в нейтральном растворе присутствует

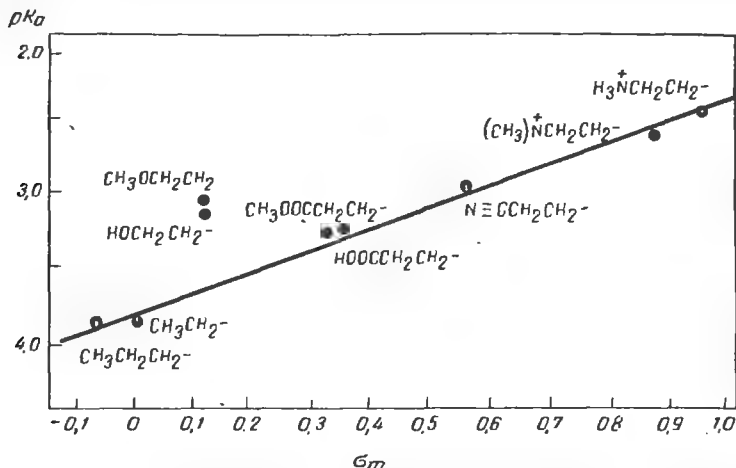
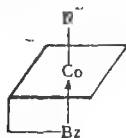


Рис. 74. Корреляция между σ_m — константами Гаммета и pK_a -значениями некоторых алкилкобаламинов.

90% (А)-формы и 10% (Б) + (В)-форм. Показано, что существует связь между положительным индуктивным эффектом алкильной группы в алкилкобаламинах и легкостью протонирования нуклеотидного основания [32]. Увеличение электронной плотности на атоме кобальта за счет влияния аксиального лиганда приводит к ослаблению кобальт-бензимидазольной связи. На рис. 74 показана количественная связь между индуктивным эффектом алкильной группы и константой ионизации нуклеотидного основания в алкилкобаламинах. Тот факт, что значения pK_a линейны относительно значений *мета*- σ , указывает, что индуктивный эффект заместителя передается через два атома углерода к атому кобальта и нуклеотидному основанию [32].

Изучение окислительно-восстановительных превращений кобаламинов привело к установлению строения производных одно-, двух- и трехвалентного кобальта. Витамин B_{12s} — производное Co^I — является промежуточным соединением в некоторых биохимических реакциях, таких, как образо-

**Влияние алкильного заместителя на константу ионизации
безимидазольного лиганда**



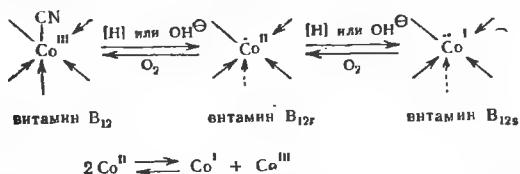
R	pK _a	R	pK _a
H ₃ N ⁺ CH ₂ CH ₂ -	2,45	HOCH ₂ CH ₂ -	3,15
(CH ₃) ₃ N ⁺ CH ₂ CH ₂ -	2,61	HOOCCH ₂ CH ₂ -	3,25
N≡CCH ₂ CH ₂ -	2,95	CH ₃ CH ₂ CH ₂ -	3,84
CH ₃ OCH ₂ CH ₂ -	3,10	CH ₃ CH ₂ -	3,87

вание метана [33, 34], биосинтез метионина [35], превращение оксикобаламина в его коферментную форму [36]. Недавно наличие витамина B_{12s} во время ферментативной реакции было доказано спектральным методом [37]. Pratt показал, что в нейтральном растворе витамин B_{12s} не имеет строения гидрида кобаламина, а является производным Co^I [36]. Витамин B_{12s} участвует в большом числе химических реакций, которые приводят к образованию алкилcobаламинов. Тот факт, что при реакции, например, с йодистым метилом не удалось выделить йодистоводородной кислоты, четко доказал, что витамин B_{12s} не имеет строения гидрида.

Природа витамина B_{12r} окончательно установлена методами ЭПР и контролируемого полярографического восстановления [39, 40]. Было показано, что витамин B_{12r} — низко-спиновый комплекс Co^{II}. Спектр поглощения витамина B_{12r} — производного Co^{II} — также наблюдался в ходе таких ферментативных реакций, как биосинтез метионина и кобамидного кофермента [41]. Это, однако, не является убедительным доказательством участия витамина B_{12r} в таких реакциях, так как его спектры, как было отмечено, очень сходны со спектрами 5-координационных комплексов трехвалентного кобальта. На основании детального изучения ЭПР-спектров Co^{II} производных кобаламинов и кобинамидов высказано предположение, что аминокислотные остатки B₁₂-зависимых ферментов могут замещать в качестве «нижнего» лиганда диметилбензимидазольную часть коба-

мидного кофермента [42]. Нет сомнения, что исследование ЭПР-спектров V_{12} -зависимых ферментов окажется одним из наиболее тонких методов изучения поведения кобаламинов в биохимических реакциях.

Найдено, что в мягких условиях происходит диспропорционирование витамина V_{12r} в V_{12s} и V_{12a} [43]. Взаимные переходы показаны на схеме.



Установлено также, что витамин V_{12a} в растворе находится в равновесии с V_{12r} , образующимся через самовосстановительный процесс, который медленно протекает в щелочных растворах, но не наблюдается в нейтральных или слабокислых [44]. Таким образом, появление V_{12r} в растворах витамина V_{12a} вызывает образование равновесных количеств витамина V_{12s} в анаэробных условиях.

Витамин V_{12s} является сильным нуклеофилом (нуклеофильность витамина V_{12s} , вычисленная как отношение констант скоростей реакции с йодистым метилом к скорости его алкоголиза, оказалась равной 14,4) [45]. Такая чрезвычайно высокая нуклеофильность дает возможное объяснение высокой активности витамина V_{12} при чрезвычайно низких концентрациях.

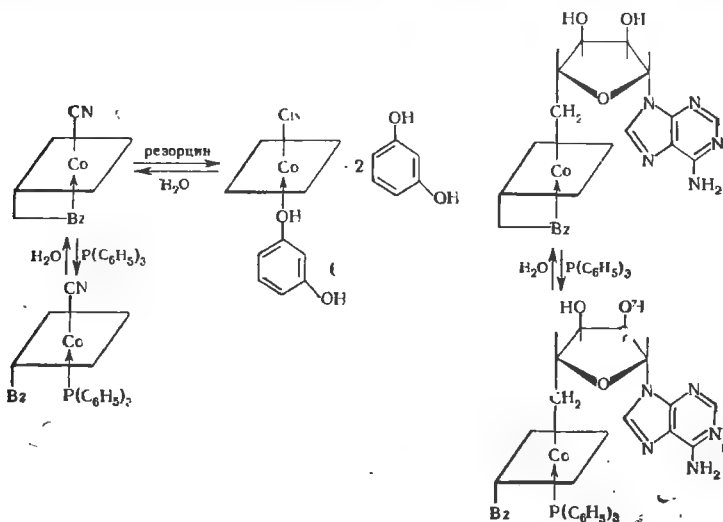
Подводя итоги рассмотрению результатов физико-химических исследований кобаламинов и кобамидных коферментов, следует подчеркнуть, что, во-первых, эти исследования могут рассматриваться как начальный этап в изучении состояния молекулы коррина в ферментативных превращениях и, во-вторых, изучение основного состояния и особенностей строения кофермента является действительным фундаментом для понимания механизма действия кофермента. Особенно важно подчеркнуть, что стереохимическим следствием строения кобаламина оказывается его способность давать 5-координационные комплексы. Такая геометрия молекулы идеальна для быстрых каталитических реакций.

Как показали спектральные исследования, реальное электронное состояние атома кобальта таково, что различие между (Co^{II}) и (Co^{III}) не очень велико. В свою очередь это обстоятельство приводит к тому, что энергия активации

для окислительно-восстановительных реакций у кобамидного кофермента может быть также очень небольшой. Наличие сильных *цис*- и *транс*-эффектов в кобаламинах в сочетании с указанными выше особенностями кобаламинов может привести к тому, что координация кофермента на молекуле апофермента существенно изменит химическую реакционную способность Co-C-связи. Весьма возможно, что именно в этом заключается функция белка в B_{12} -зависимых ферментах.

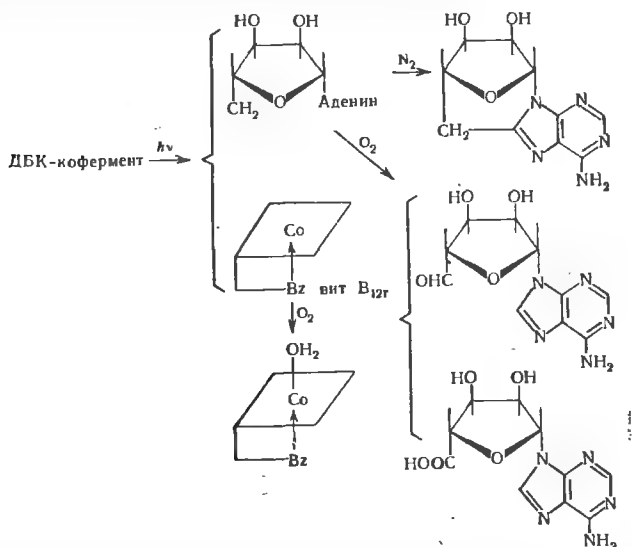
Не вызывает сомнения важность детального исследования химического поведения и процессов замещения Co-S-аксиальных лигандов в корринах для понимания механизма действия кобамидного кофермента. Начальной стадией реакций нуклеофильного замещения в ряду кобаламинов является разрыв кобальт-бензимидазольной связи и последующая координация нуклеофила с атомом кобальта с «нижней» стороны корринового кольца.

Это имеет место при подкислении растворов кобаламинов. Показано также, что при действии таких нуклеофилов, как резорцин и трифенилфосфин, на цианкобаламин и кобамидный кофермент наблюдается только разрыв кобальт-бензимидазольной связи [46].

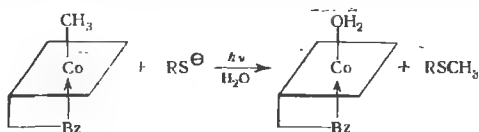


В кобамидном коферменте Co-C-связь чрезвычайно чувствительна к действию различных агентов, вещество разлагается при облучении светом на 50% за 10 минут в

разбавленном растворе и теряет свою коферментную активность [47]. На основании изучения продуктов реакции при облучении предложен следующий механизм фотолитического разложения, который состоит в гомолитическом разрыве кобальт-углеродной связи с образованием 5'-дезоксиаденозильного радикала и витамина B_{12r}.

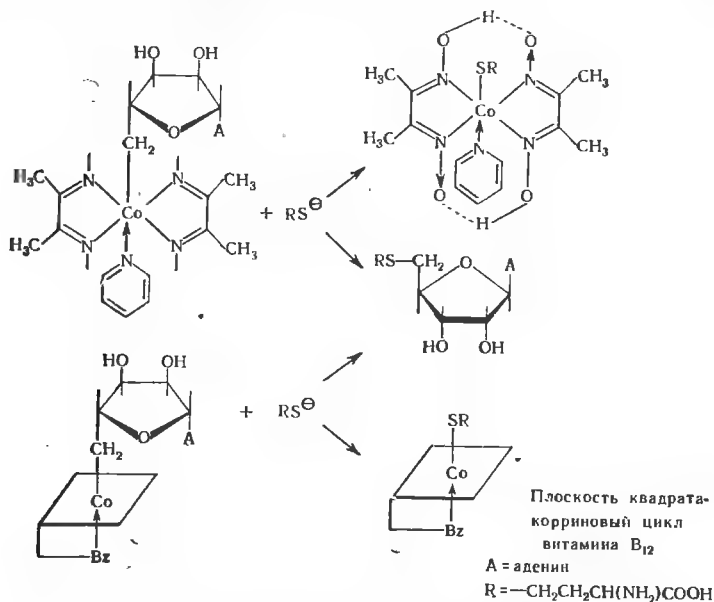


5'-Дезоксиаденозильный радикал в анаэробных условиях дает 8,5'-циклоаденозин, в то время как в присутствии кислорода образуются аденозин-5'-альдегид и аденозин-5'-карбоновая кислота [48]. Подобным же образом проходит фотолитическое разложение алкилкобаламинов. Когда фотолиз проводится в присутствии акцептора радикалов, то наблюдается захват радикала акцептором, прежде чем он претерпевает дальнейшие превращения [49]. Так, фотолитическое разложение метилкобаламина в присутствии цистеина или гомоцистеина приводит к образованию S-метилцистеина или метионина соответственно.



где R = $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ / $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$

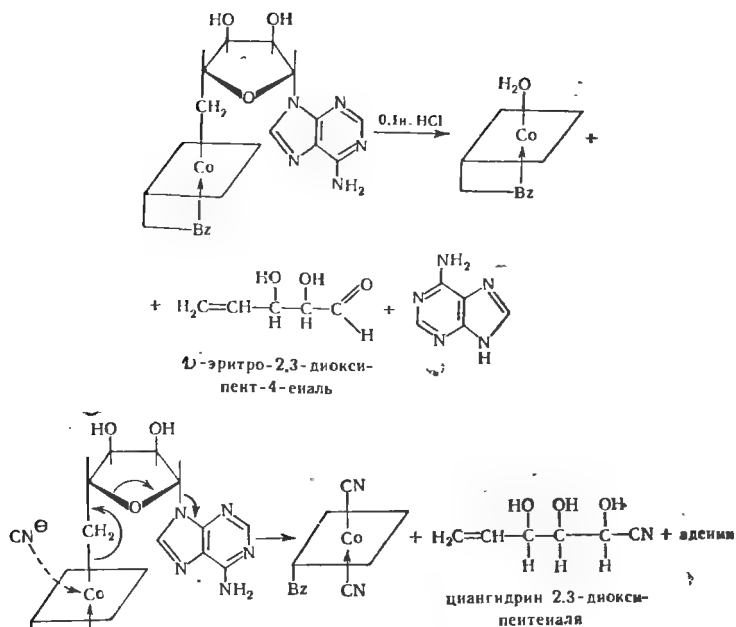
Проведение реакции кобамидного кофермента в таких условиях с гомоцистеином дает S-аденозилгомоцистеин [50]. В нашей лаборатории показано, что подобный перенос 5'-дезоксаденозильного остатка наблюдается и в случае аденозилкобалоксима — модельного соединения кобамидного кофермента, но в отличие от Shapiro, мы наблюдали в обоих случаях образование кобальт-S-соединений, что согласуется с механизмом фотолитического разложения кобамидного кофермента [50, 51].



Кислый гидролиз кобамидного кофермента в мягких условиях сопровождается гетеролитическим расщеплением Co-C-связи с образованием аквакобаламина, аденина и D-эритро-2,3-дигидропент-4-енала [52].

Гетеролитический механизм разложения кобамидного кофермента щелочным цианидом предложен Johnson и др. [53].

Скорость цианидного разложения алкилкобаламинов, как было предложено Müller, определяется степенью поляризации Co-C-связи [54]. Если разложение проходит по S_N2-механизму, то увеличение электрофильности атома кобальта должно облегчить нуклеофильное замещение у кобальта [55]. Очевидно, что увеличение электроноакцеп-



торных свойств алкильного лиганда приводит к увеличению электрофильности атома кобальта и увеличению скорости реакции цианидного расщепления.

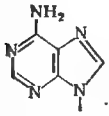
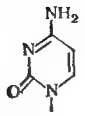
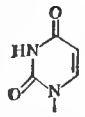
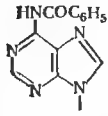
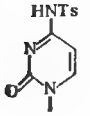
Влияние аксиального лиганда на цианидное расщепление кобаламинов

Аксиальный лиганд	Константа скорости цианидного разложения, $k \times 10^4$ сек. ⁻¹
(CH ₃) ₃ N ⁺ CH ₂ CH ₂ -	66,5
N ≡ CCH ₂ CH ₂ -	11,5
CH ₃ OOCCH ₂ CH ₂ CH ₂ -	3,0
CH ₃ OOCCH ₂ -	2,1

Исследование кинетики цианидного расщепления нуклеозидных аналогов ДБК-кофермента позволило выявить роль агликона в этой реакции. Реакция цианирования в принципе оказалась удобной модельной реакцией, позволяющей количественно оценить *транс*-эффекты в кобаламинах. Та-

кой подход был использован для изучения эффекта агликона в дезокси-нуклеозидной части на устойчивость Со-С-связей в ДБК-коферменте и его нуклеозидных аналогах. Результаты измерений приведены ниже.

Влияние агликона на цианидное расщепление 5'-дезоксинуклеозилкобаламинов

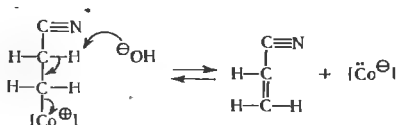
Агликон	Константа скорости цианидного расщепления, $k \times 10^4$ сек. ⁻¹
	$8,4 \pm 0,4$
	$3,5 \pm 0,2$
	$2,9 \pm 0,1$
	$0,44 \pm 0,02$
	$0,97 \pm 0,05$

Из этих данных следует, что введение электроноакцепторного заместителя в ядро приводит к упрочению Со-С-связи. Оказалось, что 6-N-бензоильное производное кофермента расщепляется цианидом очень медленно. Аналогичный эффект наблюдали при введении п-толуолсульфонил в аминогруппу цитозина цитидильного аналога кофермента [56]. Все эти данные делают возможным предположение о «сверхсопряжении» гетероцикла с атомом металла. Известно, что при действии цианида расщепление Со-С-связи в алкильных аналогах кобамидного кофермента не происходит. Апуриновый аналог ДБК-кофермента — 6-дезоксиглюкозилкобаламин — медленно подвергался в отсутствие света цианидному расщеплению. Таким образом, связи атома кобальта с *транс*-аксиальными лигандами, пространственно отдаленные и формально не сопряженные с остатком агликона, весьма чувствительны к химическим модификациям пуринового или пиримидинового ядра. Это является подтверждением особой роли аденинового остатка, возможно определяющей биокаталитические свойства кофермента.

Hogenkamp и др. показали, что цианидное разложение цианэтилкобаламина не включает цианид-катализируемую S_N2 -реакцию замещения,

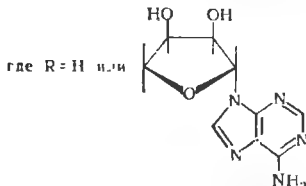
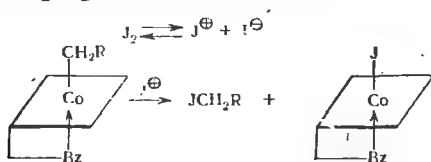
а является скорее OH^- -катализируемой E_2 -реакцией элиминирования, в которой электронная пара Со-С-связи остается с атомом кобальта [57]. Продуктами щелочной дегградации цианэтилкобаламина были витамин B_{12s} и акри-

лонитрил, причем скорость разложения зависела от концентрации OH^- -ионов. Реакция обратима, поскольку витамин B_{12} может реагировать с акрилонитрилом, давая цианэтил-кобаламин.



Эта реакция является единственным найденным примером обратимой гетеролитической диссоциации кобальт-углеродной связи.

Bernhauser и др. нашли, что кобамидный кофермент и метилкобаламин разлагаются йодом с образованием йодкобаламина и 5'-йод-5'-дезоксадеозина или метилиодида, соответственно [58].

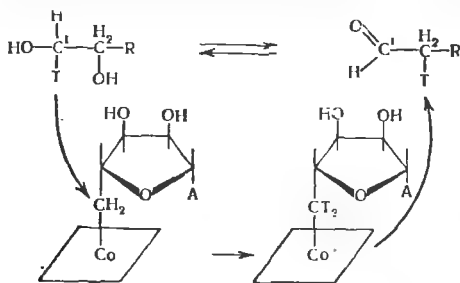


Эксперименты с использованием йодмоноклорида указывают, что этот гетеролитический разрыв Co-C-связи начинается с электрофильной атаки йод-катиона на атом углерода, присоединенный к атому кобальта. Оказалось, что метилкобаламин йодом расщепляется быстрее, чем кобамидный кофермент, что связано, вероятно, с тем, что вследствие стерических препятствий у кофермента захват относительно большого йод-катиона затруднен.

Гидрирование метилкобаламина в присутствии платины приводит к образованию витамина $\text{B}_{12\text{S}}$ и выделению метана [49]. Кобамидный кофермент не претерпевает восстановительного расщепления, вероятно, из-за стерической затрудненности подхода восстановительного агента к атому кобальта [49].

Исследование реакционной способности Co-C-связи в кобамидных коферментах свидетельствует о достаточно большой ее лабильности при воздействии как физических факторов, например света, так и химических реагентов. Важным свойством металлоорганической связи в коферменте является способность претерпевать как гомолитический, так и гетеролитический распад. На примере метилкобаламина рассмотрим некоторые возможные варианты типов связи Co-CH₃ [14]. Ее можно представить как анион, связанный с трехвалентным ионом кобальта Co^{III}CH₃⁻, или как катион, связанный с одновалентным ионом Co^ICH₃⁺, или, возможно, как систему, по неясным пока причинам закрытую для гомолитического распада: Co^{II}-CH₃. Если это действительно так, то даже небольшие изменения в длинах связей могут привести к большим изменениям реакционной способности Co-C-связи. Весьма возможно, что в фермент-субстратном комплексе как раз и происходит изменение свойств металлоорганической связи.

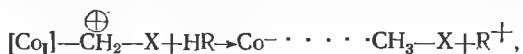
Применение меченых субстратов в биохимических превращениях позволило обнаружить участие металлоорганической связи в процессе биокатализа. Было установлено, что в реакциях, проходящих с участием кобамидного кофермента, наблюдается перенос трития от C-1-положения субстрата в C-5'-положение кобамидного кофермента [59, 60].



Показано также, что тритилированный кофермент переносит тритий в C-2-положение продукта. То обстоятельство, что в изотопный обмен оказываются вовлеченными оба атома при C-5'-положении кофермента, легко интерпретируется, если допустить, что имеет место гетеролитический разрыв металлоорганической связи и образуется карбониевый ион. Это предположение не противоречит результатам, полученным в модельных химических экспериментах, например, Hogenkamp [57].

Итак, допущение обратимой диссоциации Со-С-связи в биокаталитическом акте позволяет предположить 3 возможных пути этой диссоциации: первый, когда электронная пара связи остается с атомом кобальта и образуются карбониевый ион и Co^{I} -производное кобаламина; второй, когда электронная пара остается на дезоксиинуклеозидной части и образуются карбанион и Co^{II} -производное кобаламина, и третий — гомолитический распад. Замечательной особенностью ДБК-кофермента является то, что в модельных экспериментах реализуются все пути. Весьма возможно, что эти пути осуществляются и при функционировании кофермента в биохимической системе. При этом один путь через карбокатион или Co^{II} -кобаламин соответствует «нормальному» превращению в биокаталитическом процессе, другой путь — инактивации кофермента, так как известно, что обрыв процесса катализа сопровождается образованием оксикобаламина — производного Co^{III} .

На основе модельных экспериментов предложен ряд схем, иллюстрирующих механизм действия ДБК-кофермента. Однако следует отметить, что пока не существует удовлетворительной химической модели действия ДБК-кофермента. Хотя изучение модельных систем является необходимой стадией в исследовании ферментативных реакций, важно, чтобы они были соотнесены с механизмом ферментативной реакции. При этом правильность химической модели определяется возможностью с помощью ее объяснить максимальное число экспериментальных фактов, имеющих отношение к ферментативным системам. Совпадающее образование одинаковых или сходных продуктов реакции в обоих случаях само по себе не гарантирует правильности модельной системы. В наиболее общей форме химический смысл функционирования кофермента, связанного с апоферментом, может быть выражен в уравнении [14].



где RH — субстрат и X — апофермент, связанный с ДБК-коферментом.

Образующийся из субстрата R^+ карбониевый ион способен претерпевать перегруппировку углеродного скелета и присоединяет водород. О причинах активации Со-С-связи кофермента в биохимической системе в настоящее время можно лишь строить предположения. Одной из возможных причин является вмешательство ароматических аминокислотных остатков белка в π - π взаимодействие аденина с

корриновым кольцом кофермента. Результатом такого вмешательства может быть возникновение значительного напряжения Со-С-связи. В модельных экспериментах было показано, что при реакциях вторичных алкилгалогенидов с витамином В₁₂ вместо нормальных алкилкобаламинов образуются алкены.



Эта реакция элиминирования бром-иона ускорялась в присутствии Со^I-производных и были получены факты, подтверждающие, что образование напряженной Со-С-связи — промежуточный этап в получении алкена [14].

Таким образом, до настоящего времени механизм действия кобамидного кофермента, несмотря на большое число работ в этой области, остается неясным. Однако нет сомнения в том, что дальнейшее изучение природы и особенностей Со-С-связи в кобаламинах позволит построить адекватную неферментативную модель действия кобамидного кофермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barker H., Weissbach H., Smith R. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1958, **44**, 1093.
2. Yagiri Y. J. Vitaminol., 1967, **13**, 197.
3. Lenhart P. Proc. Roy. Soc. (A), 1968, **303**, 45.
4. Ladd J., Hogenkamp H., Barker H. J. Biol. Chem., 1961, **236**, 2114.
5. Lenhart P., Hodgkin D. Nature, 1961, **192**, 937.
6. Moskophidis M., Friedrich W. Z. Naturforsch., 1968, **236**, 752.
7. Friedrich W. Biochem. Z., 1965, **342**, 143.
8. Friedrich W. Z. Naturforsch., 1966, **216**, 138.
9. Friedrich W., Moskophidis M. Z. Naturforsch., 1968, **236**, 804.
10. Friedrich W., Nordmeyer J. Z. Naturforsch., 1968, **236**, 1119.
11. Müller O., Müller G. Biochem. Z., 1963, **337**, 179.
12. Schrauzer G., Lee L., Sibert J. J. Am. Chem. Soc., 1970, **92**, 2997.
13. Brodie J. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1969, **62**, 461.
14. Hill H., Pratt J., Williams R., Phil D. Chem. Brit., 1969, **5**, 156.
15. Morley C., Blakley R. Biochemistry, 1967, **6**, 88.
16. Smith E., Mervyn L., Muggleton P., Johnson A., Shaw N. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, **112**, 565.
17. Юркевич А. М., Рудакова И. П., Поспелова Т. А. ЖОХ, 1969, **39**, 425.
18. Hill J., Pratt J., Williams R. J. Chem. Soc., 1964, 5194.
19. Schrauzer G. Naturwissenschaften, 1966, **53**, 459.
20. Firth R., Hill H., Pratt J., Williams R., Jackson W. Biochemistry, 1967, **6**, 2178.
21. Draper R., Ingraham L. Arch. Biochem. Biophys., 1968, **125**, 1022.
22. Vallee B., Williams R. Proc. natn. Acad. Sci. USA, 1968, **59**, 498.
23. Firth R., Hill H., Pratt J., Thorp R., Williams R. J. Chem. Soc., A, 1968, 2428.

24. *Рощупкина О. С., Рудакова И. П., Поспелова Т. А., Юркевич А. М., Бородько Ю. Г.* ЖОХ, 1970, 40, 466.
25. *Schrauzer G., Windgassen R.* J. Am. Chem. Soc., 1966, 88, 3738.
26. *Hill H., Mann B., Pratt J., Williams R. J.* Chem. Soc., A, 1968, 564.
27. *Cockle B., Hill H., Williams R., Mann B., Pratt J.* Biochim. Biophys. Acta, 1970, 215, 415.
28. *Hogenkamp H., Holmes S.* Biochemistry, 1970, 9, 1866.
29. *Firth R., Hill H., Pratt J., Thorp R., Williams R. J.* Chem. Soc., 1969 A, 381.
30. *Hayward G., Hill H., Pratt J., Vanston N., Williams R. J.* Chem. Soc., 1965, 6485.
31. *Firth R., Hill H., Mann B., Pratt J., Thorp R., Williams R. J.* Chem. Soc., A, 1968, 2419.
32. *Hogenkamp H.* Fed. Proc., 1966, 25, 1623.
33. *Wood J., Wolfe R.* Biochim. Biophys. Res. Commun., 1966, 22, 119.
34. *Blaylock B., Stodman T.* Biochim. Biophys. Res. Commun., 1964, 17, 475.
35. *Weissbach H., Redfield B., Dickerman H., Brot N. J.* Biol. Chem., 1965, 240, 856.
36. *Vitols E., Walker G., Huennekes F. J.* Biol. Chem., 1966, 241, 1455.
37. *Taylor R., Hanna M.* Biochim. Biophys. Res. Commun., 1970, 38, 758.
38. *Das P., Hill H., Pratt J., Williams R.* Biochim. Biophys. Acta, 1967, 141, 644.
39. *Schrauzer G., Lee L. J.* Am. Chem. Soc., 1968, 90, 6541.
40. *Cockle S., Hill H., Pratt J., Williams R.* Biochim. Biophys. Acta, 1969, 177, 686.
41. *Taylor R., Weissbach H. J.* Biol. Chem., 1967, 242, 1502.
42. *Bayston J., Looney F., Pilbrow J., Winfield M.* Biochemistry, 1970, 9, 2164.
43. *Yamada Ryo-hei, Shimizu S., Fukui S.* Biochemistry, 1968, 7, 1713.
44. *Lee Lian-Pin, Schrauzer G. J.* Am. Chem. Soc., 1968, 90, 5274.
45. *Schrauzer G., Deutsch E., Windgassen.* J. Am. Chem. Soc., 1968, 90, 2441.
46. *Юркевич А. М., Рудакова И. П., Поспелова Т. А.* ЖОХ, 1969, 39, 425.
47. *Brady R., Barker H.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 1961, 4, 373.
48. *Hogenkamp H.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, 112, 552.
49. *Dolphin D., Johnson A., Rodrigo R., Shaw N.* Pure and Applied Chem., 1963, 7, 539.
50. *Shapiro S., Schlenk F.* Advan. Enzymol., 1960, 22, 243.
51. *Юркевич А. М., Амагаева А. А., Рудакова И. П.* ЖОХ, 1968, 38, 1650.
52. *Bonnet R.* Chem. Rev., 1963, 63, 590.
53. *Johnson A., Shaw N.* Proc. Chem. Soc., 1960, 420.
54. *Müller O., Müller G.* Biochem. Z., 1962, 336, 299.
55. *Johnson A., Shaw N. J.* Chem. Soc., 1962, 4608.
56. *Рудакова И. П., Поспелова Т. А., Юркевич А. М.* ЖОХ, 1970, 40, 2493.
57. *Barnett R., Hogenkamp H., Abeles R. J.* Biol. Chem., 1966, 241, 3641.
58. *Bernhauer K., Irion E.* Biochem. Z., 1964, 339, 521.
59. *Abeles R., Beck W. J.* Biol. Chem., 1967, 246, 3589.
60. *Frey P., Essenbreg M., Abeles R. J.* Biol. Chem., 1967, 242, 5369.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ В₁₂-ЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ

А. А. ПОЗНАНСКАЯ

Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва

В течение последних 3—4 лет наблюдается значительный прогресс в выяснении механизма действия В₁₂-зависимых ферментов. Это связано с большими успехами в области химии кобамидного кофермента, синтеза целого ряда его аналогов и производных синтеза и изучения свойств модельных соединений (кобалооксимов), а также выделения В₁₂-зависимых ферментов в высокоочищенном состоянии. Однако до сих пор мы не имеем четкого представления о том, каким образом работают В₁₂-зависимые ферменты; многие стороны механизма их действия остаются загадочными и являются предметом механистических гипотез, носящих порой спекулятивный характер.

В настоящее время все ферментативные реакции, протекающие с участием корриноидов, можно разделить на 2 груп-

Т а б л и ц а 25

Классификация В₁₂-зависимых реакций

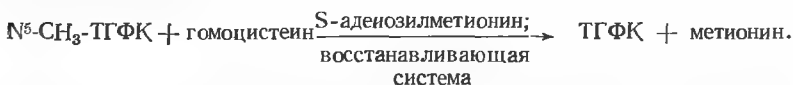
Группа реакций	Реакции	Химическая природа кофермента	Распространение
1.	Синтез метионина Образование метана Синтез ацетата из CO ₂	Метилкобаламин	Животные и микроорганизмы Микроорганизмы »
2.	Глутаматмутазная Метилмалонил-КоА-мутазная Диолдегидратазная Глицеролдегидратазная Этаноламиндеаминазная Изомеризация β-лизина Рибонуклеотидредуктазная Изомеризация α-метилглутаровой кислоты в диметилмалеиновую кислоту	ДБК-кофермент	Микроорганизмы Животные и микроорганизмы Микроорганизмы » » » »

пы на основании химической природы корриноида, действующего как кофермент (табл. 25).

К 1-й группе относятся реакции трансметилирования, требующие витамина В₁₂ или одного из его аналогов. Общим для этих реакций является образование Со-метилкорриноидов как промежуточных переносчиков метильной группы. Ко 2-й группе относятся реакции, катализируемые ферментами, простетической группой которых является кобамидный кофермент (5'-дезоксиаденозилкобаламин, ДБК-кофермент). Для этих реакций общим является перенос водорода и образование новой углерод-водородной связи.

Реакции трансметилирования

Синтез метионина. Конечной ферментативной стадией в биосинтезе метионина является перенос метильной группы с N⁵-метил-тетрагидрофолиевой кислоты (N⁵-CH₃-ТГФК) на гомоцистеин:



Необходимыми кофакторами этой реакции являются S-аденозилметионин (SAM) и восстанавливающая система, в качестве которой могут выступать ФАДН₂, ФМНН₂, дитиотрейтол и др. Указанная реакция катализируется метионинсинтетазой (N⁵-метил-тетрагидрофолатгомоцистеин-метилтрансфераза), активность которой зависит от витамина В₁₂ и которая впервые была обнаружена в бесклеточных экстрактах *E. coli* [1]. Позднее метионинсинтетаза была найдена в печени крысы, свиньи и цыпленка [2, 3]. В 1964 г. Guest и др. показали, что связанная с кобальтом метильная группа метилкобаламина может спонтанно переноситься на гомоцистеин без участия кофакторов и что эта реакция ускоряется в 10 раз при добавлении бактериальной метионинсинтетазы; для реакции не требуется никаких кофакторов [4]. Участие свободного метилкобаламина как промежуточного продукта в синтезе метионина было исключено на основании низкой скорости переноса CH₃-группы с метилкобаламина по сравнению с N⁵-CH₃-ТГФК. Поэтому было постулировано, что связанный с ферментом метилкобаламин является истинным промежуточным продуктом в этой реакции: сначала N⁵-CH₃-ТГФК метилирует

связанный с белком витамин B_{12} , а затем уже метилкобаламин переносит свою метильную группу на гомоцистеин. Эта гипотеза получила свое подтверждение после выделения метионинсинтетазы в высокоочищенном состоянии.

В 1967 г. одновременно авторы работ [5] и [6] сообщили о получении гомогенной метионинсинтетазы из *E. coli*. Очищенный фермент имеет молекулярный вес 140 000 и содержит в качестве прочно связанной протетической группы сульфиткобаламин [с атомом кобальта связана группа $-O-SO_2H$]. При обработке метионинсинтетазы 80% горячим спиртом удается извлечь только 50% кофермента. Наиболее очищенные препараты метионинсинтетазы содержат 0,35 моля кофермента на 1 моль белка [7].

Абсорбционный спектр холофермента с максимумами при 322, 405 и 470 нм дает основание предполагать, что в холоферменте нуклеотидный лиганд кофермента (5,6-диметилбензимидазол) не координирован с атомом кобальта.

Протетическая группа метионинсинтетазы легко пропилируется йодистым пропилом; при этом происходит присоединение остатка пропила к кобальту [8]. Пропилирование фермента сопровождается потерей его активности, которая полностью восстанавливается при удалении пропильной группы. Корреляция пропилирования и депропилирования метионинсинтетазы с потерей и восстановлением ее активности указывает на прямое вовлечение атома кобальта в транспорт CH_3 -группы. Это заключение было подтверждено тем, что обработка метионинсинтетазы N^5-CH_3-TGFK защищает фермент от химического пропилирования и инактивации и, наоборот, пропилирование предотвращает перенос метильной группы с N^5-CH_3-TGFK на гомоцистеин.

В 1968 г. было показано, что при инкубации $N^5-C^{14}H_3-TGFK$ с очищенной метионинсинтеазой в отсутствие гомоцистеина происходит образование меченого метилированного фермента в результате переноса $C^{14}H_3$ -группы с субстрата на атом кобальта кофермента [9]. Меченый метилкобаламин был выделен из метилированной метионинсинтетазы путем экстракции горячим этанолом и идентифицирован с синтетическим образцом. Rudiger и Jaenicke [10] получили кинетические доказательства образования связанного с ферментом метилкобаламина как промежуточного продукта при переносе CH_3 -группы с N^5-CH_3-TGFK на гомоцистеин. Деметилирование метилированного фермента при реакции его с гомоцистеином носит двухфазный характер [11]. Оно состоит из начальной чрезвычайно быстрой реак-

ции, которая проходит за 5 сек. при 37°, и последующей очень медленной реакции, длящейся в течение 15 мин. Около 70% метильных групп переносятся на гомоцистеин в течение первых 5 сек. со скоростью, которая настолько велика, что ее обычными методами нельзя измерить. После переноса метильной группы метилкобаламин, связанный с апоферментом, превращается в оксикобаламин. Таким образом, в этих работах было получено прямое доказательство образования метилированного фермента, что позволило реакцию трансметилирования разделить на 2 стадии: первая стадия заключается в переносе метильной группы с N^5 -CH₃-ТГФК на активный центр метионинсинтетазы с образованием метил-B₁₂-кофермента; эта стадия зависит от SAM и присутствия восстанавливающей системы. Последняя необходима для восстановления кобальта до одновалентного состояния, что является необходимым условием для последующего его алкилирования. Вторая стадия заключается в переносе CH₃-группы с метилированного фермента на гомоцистеин и не требует никаких кофакторов.

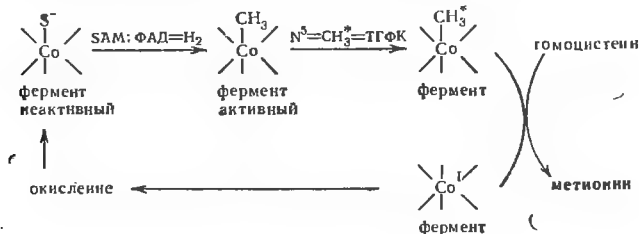
В 1970 г. Taylor, Hanna на основании спектрофотометрических исследований получили прямое доказательство образования промежуточного состояния фермента, в котором атом Co кобаламинового хромофора находится в восстановленном одновалентном состоянии при переносе метильной группы на гомоцистеин [12].

Те же авторы сообщили, что в процессе выделения метилсинтетазы из *E. coli* ими в качестве сопутствующего белка была выделена и очищена ФАД-содержащая диафораза, которая в присутствии дитиотрейтола полностью заменяет потребность метионинсинтетазы в ФАДН₂ или ФМНН₂ [13]. Эта диафораза является природной восстанавливающей системой, необходимой для синтеза метионина.

Долгое время необходимость SAM в реакции образования метионина оставалась загадочной. SAM может служить метилирующим агентом и в отсутствие гомоцистеина метилировать фермент.

Taylor, Weissbach выдвинули гипотезу о том, что SAM является активатором метионинсинтетазы и его активирующее действие заключается в предварительном метилировании фермента, в результате которого образуется активная метил-B₁₂-метионинсинтетаза. В 1969 г. эти авторы экспериментально доказали, что метионинсинтетаза сначала метилируется SAM в течение первых 60 сек. реакции, а затем происходит обмен метильной группы метилированного

фермента с метильной группой $N^5\text{-CH}_3\text{-ТГФК}$ [14]. Так, если проводить опыт с C^{14} -метил-SAM и немеченой $N^5\text{-CH}_3\text{-ТГФК}$, то сначала происходит образование метилированного меченого фермента, а затем обмен меченой метильной группы фермента на немеченую метильную группу $N^5\text{-CH}_3\text{-ТГФК}$. В результате обменной реакции происходит образование немеченого метилированного фермента и меченой $N^5\text{-CH}_3\text{-ТГФК}$.

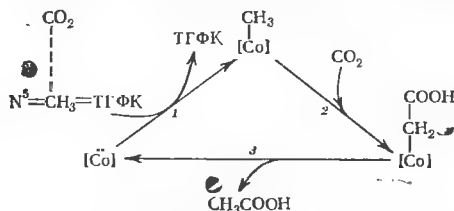


Авторы считают, что SAM метилирует неактивную форму фермента, в которой он выделяется из бесклеточных экстрактов. Такое метилирование необходимо для «запуска» всей реакции.

Образование метана. В 1966—1967 гг. впервые было установлено, что образование метана у бактерий протекает с участием корриноидных соединений [16]. Углерод метана возникает из нескольких источников: CO_2 , формиата, метанола, β -углеродного атома серина. Кроме того, субстратом являются $N^5\text{-CH}_3\text{-ТГФК}$ и метилкобаламин, что с очевидностью указывает на связь между этой системой и метилтрансферазой. Метанол служит не только субстратом для образования метана, но и как метильный донор для витамина B_{12} в процессе превращения его в метилкобаламин. Все эти данные с несомненностью показывают, что, как и в синтезе метионина, метилкобаламин является нормальным промежуточным продуктом. В последние годы были частично очищены препараты фермента, катализирующие образование метана из метилкобаламина или $N^5\text{-CH}_3\text{-ТГФК}$ [17]. Простетической группой этого фермента служит α -(5-оксибензимидазолил)-аквокобамид. Инактивация фермента пропилиодидом и реактивация его под влиянием света указывают на то, что «верхнее» осевое координационное положение кобальта является центром активации метила в образовании метана.

Синтез ацетата из CO_2 . В 1964 г. было установлено участие производных витамина B_{12} в образовании ацетата при сбраживании глюкозы *Clostridium tetanomorphum* [18]. Далее было найдено, что метилкобаламин является эффективным предшественником метильного углерода ацетата. В 1967 г. было показано, что метилкоррииноиды, образующиеся при обработке клеток C^{14}O_2 , связаны с белком, и метильная группа таких связанных коррииноидов может, подобно свободному метилкобаламину, превращаться в меченный по метильной группе ацетат бесклеточными экстрактами *Cl. tetanomorphum* [19].

Из этих экстрактов были выделены 2 фракции, одна из которых катализировала метилирование связанного с белком коррииноида, а другая — расщепление карбоксиметилкобаламина до ацетата. Имеющиеся в настоящее время экспериментальные данные позволяют предложить схему



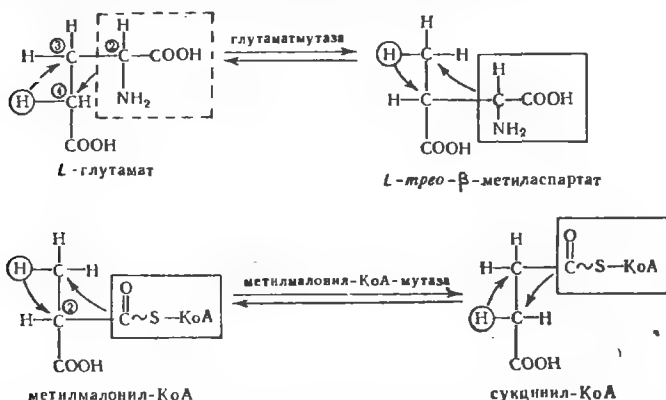
синтеза ацетата, представленную выше [20]. Сначала CO_2 восстанавливается до метильной группы (это восстановление протекает через производные формата и фолиевой кислоты), которая переносится к атому кобальта, связанного с белком коррииноида с образованием метилкоррииноида (реакция 1). Последний карбоксилируется (реакция 2) до карбоксиметилкоррииноида, который затем восстановительным путем расщепляется до ацетата и связанного с ферментом восстановленного коррииноида, вероятно содержащего Co^{I} (реакция 3).

Предложенная схема в достаточной степени гипотетична, и еще многие детали вовлечения производных фолиевой кислоты и витамина B_{12} в синтез ацетата у бактерий остаются еще ясными.

Заканчивая рассмотрение реакций трансметилирования, необходимо подчеркнуть, что всех их объединяет одно общее и главное — прямое вовлечение атома кобальта коррииноидов в перенос метильной группы и образование связанного с белком метилкобаламина в качестве промежуточного продукта.

Реакции переноса водорода

Глутамат- и метилмалонил-КоА-мутазы. Если придерживаться хронологической последовательности, то наиболее «старыми», известными реакциями, которые зависят от ДБК-кофермента, являются две мутазные реакции, заключающиеся в превращении *L*-глутамата в *трео-L*-β-метиласпартат и метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА.



Механизм обеих реакций аналогичен: в обоих случаях происходит перенос водорода от одного углеродного атома к соседнему и одновременное перемещение глицинового остатка или карбонильной тиоэфирной группы в противоположном направлении. Обе реакции обратимы и происходят без обмена переносимого водорода со средой стереоспецифическим образом [21—23].

Глутаматмутаза была очищена из бесклеточных экстрактов *Clostridium tetanomorphum* и состоит из 2 компонентов E и S, которые отдельно не активны [24, 25]. Компонент E имеет молекулярный вес 128 000, а компонент S — 17 000. Последний содержит 5 SH-групп, 2 из которых необходимы для мутазной реакции. Только компонент E связывает ДБК-кофермент, причем его связывающая способность повышается в 2 раза при добавлении избытка компонента S.

Метилмалонил-КоА-мутаза была выделена из *Propionibacterium* и печени овцы, причем оказалось, что свойства этих ферментов очень различны [26]. В частности, бактериальный фермент не чувствителен к реагентам на SH-группы, в то время как мутаза, выделенная из печени овцы, является типичным SH-ферментом. Последняя была

очищена до гомогенного состояния [27]. Холофермент содержит 1 моль на 75 000 г белка кобамидного кофермента, который очень прочно связан с апоферментом. Молекулярный вес мутазы равен 165 000. В опытах с этим ферментом было показано, что ДБК-кофермент защищает апофермент от инактивации его п-оксимеркурибензоатом и холофермент становится нечувствительным к этому реагенту. По-видимо-

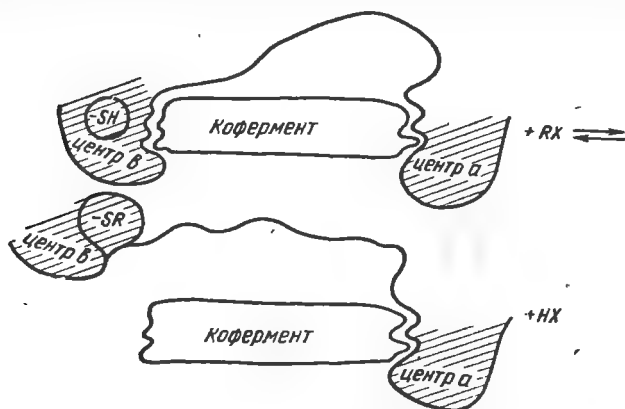


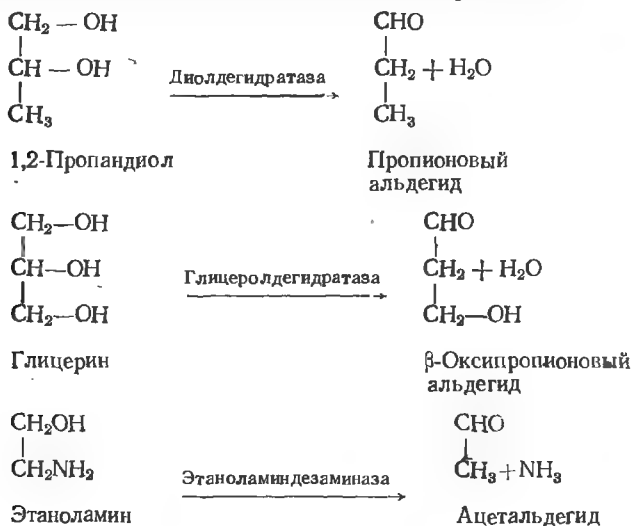
Рис. 75. Два центра связывания кофермента с апоферментом.

му, в холоферменте SH-группы замаскированы или защищены, но становятся доступными п-оксимеркурибензоату при разделении его на апо- и кофермент. Скорее всего SH-группы мутазы участвуют в присоединении кофермента к апоферменту. Однако кофермент способен присоединиться к апоферменту, у которого SH-группы заблокированы п-оксимеркурибензоатом. Этот факт указывает на возможное наличие двух центров связывания кофермента, в одном из которых локализованы SH-группы (рис. 75).

Вовлечение SH-группы в один центр (b) объясняет инактивацию фермента SH-реагентами. Расщепление фермента с последующим отсоединением кофермента, которое делает доступными SH-группы, объясняет высокую чувствительность апофермента к SH-реагентам. Блокирование SH-групп в центре b позволяет коферменту присоединяться в центре a в форме, резистентной к фотолизу, но реконституция активного холофермента путем присоединения ко второму центру b не может произойти, пока блокирующий агент не удаляется глутатионом.

Авторы считают, что многоточечное присоединение кобальдного кофермента в мутазе из животных тканей и односточечное в бактериальном ферменте частично объясняет значительные различия между этими ферментами.

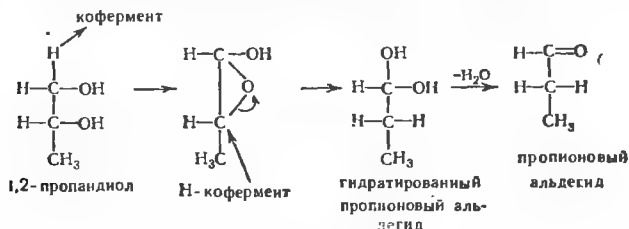
Диол-, глицеролдегидратазы и этаноламиндезаминаза. Реакции, катализируемые этими ферментами, открыты сравнительно недавно и очень близки между собой.



Рассматриваются следующие реакции: диолдегидратазная, заключающаяся во внутримолекулярной дисмутации 1,2-пропандиола в пропионовый альдегид [28]; глицеролдегидратазная, состоящая в превращении глицерина в β-оксипропионовый альдегид [29], и этаноламиндезаминазная, заключающаяся в дезаминировании этаноламина с одновременным окислением спиртовой группы в альдегидную [30].

На первый взгляд кажется, что эти реакции значительно отличаются от мутазных, так как здесь не происходит переноса в новое положение целого участка углеродной цепи. Однако на самом деле эти превращения имеют много общего. Как и в мутазных реакциях, в этих превращениях водород перемещается от С-1 к С-2 без обмена со средой стереоспецифическим образом [31, 32]. Одновременно с этим атом кислорода гидроксильной группы при С-2 перемещается к С-1 с возможным образованием гидратирован-

ного альдегида. Такое перемещение кислорода предполагает перенос водорода от С-1 к С-2 в виде гидрид-иона. Промежуточным продуктом этой реакции постулирован полуацеталь лактальдегида, который затем, теряя молекулу воды, превращается в пропионовый альдегид



Хотя в целом эта реакция представляет собой процесс дегидратации, она должна рассматриваться как внутримолекулярная окислительно-восстановительная реакция, поскольку при этом первичная спиртовая группа окисляется до альдегидной, а соседняя вторичная спиртовая группа восстанавливается до метиленовой группы [33]. Изучение механизма глицеролдегидратазной реакции показало полную аналогию с диолдегидратазной реакцией [34]. Перенос атома кислорода от С-2 к С-1 полностью аналогичен переносу углеродсодержащих групп в мутазных реакциях.

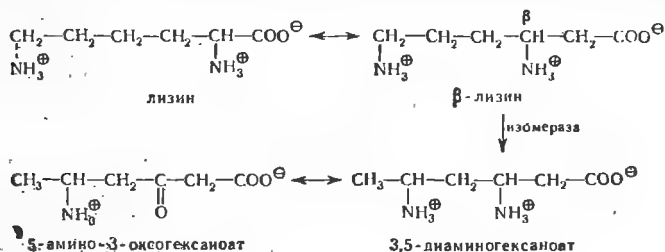
Диолдегидратаза была очищена в 200 раз из экстрактов *Aerobacter aerogenes* [35]. Помимо 1,2-пропандиола, субстратом диолдегидратазы является этиленгликоль, который она превращает в ацетальдегид. Диолдегидратаза не действует на глицерин и этим отличается от глицеролдегидратазы, частично очищенной из другого штамма *A. aerogenes* 572 польскими авторами [36]. По своим свойствам эти 2 фермента чрезвычайно близки. Апоферменты диоли и глицеролдегидратаз имеют очень непрочную связь с ДБК-коферментом, который в процессе очистки легко удаляется простой адсорбцией углем. Однако при инкубации частично очищенных апоферментов с коферментом происходит прочное его соединение с апоферментом и кофермент можно отделить от белка только путем кислотного осаждения белка, природа этих лабильных к кислоте связей между апо- и коферментом остается неизвестной. Образование активного холофермента происходит довольно медленно при низких концентрациях кофермента. Отмечается лаг-период, в течение которого происходят структурные изменения фермента,

Об этом говорит снижение его чувствительности к п-хлормеркурибензоату. Добавление реагента в начале лаг-периода вызывает 100% инактивацию, добавление через 5 минут (перед завершением лаг-периода) — 45% торможение, а добавление реагента после завершения лаг-периода вообще не влияет на активность фермента. Эти данные показывают, что кофермент защищает SH-группы апофермента от блокирования их п-хлормеркурибензоатом и что, по-видимому, SH-группы участвуют в соединении апофермента с коферментом.

Отличительным свойством этих 2 ферментов является быстрая их инактивация в отсутствие субстрата при добавлении ДБК-кофермента к апоферменту [35, 37]. Эта инактивация наблюдается в аэробных условиях и сопровождается структурными изменениями в коферменте с разрывом Co-S-связи и превращением последнего в оксикобаламин.

В 1968 г. Kaplan и др. [30] сообщили о получении в гомогенном состоянии этанолдеаминазы из бесклеточных экстрактов *Clostridium sp.* Фермент имеет молекулярный вес 520 000 и при обработке 7 М гуанидинхлоридом диссоциирует на 10 субъединиц. Один моль нативного фермента содержит 1 моль SH-групп, однако в присутствии лаурилсульфата возможно оттитровать 15 SH-групп в расчете на молекулу этаноламиндеаминазы. Фермент содержит в качестве прочно связанного хромофора α -(аденилил)-кобамид. При отделении этого хромофора активность этанолдеаминазы при определении ее с добавленным ДБК-коферментом возрастает на 38%. На основании кинетических данных показано, что одна молекула апофермента соединяется с двумя молекулами кофермента [39].

Изомеразы β -лизина. В 1967 г. в лаборатории Barker при изучении распада лизина до аммиака, ацетата и бутирата под влиянием бесклеточных экстрактов *Clostridium stick-*



landii была открыта еще одна реакция, в которой принимает участие ДБК-кофермент [40]. Лизин сначала превращается в β -лизин путем обратимого переноса аминогруппы от С-2 к С-3; в этой реакции участвует пиридоксальфосфат.

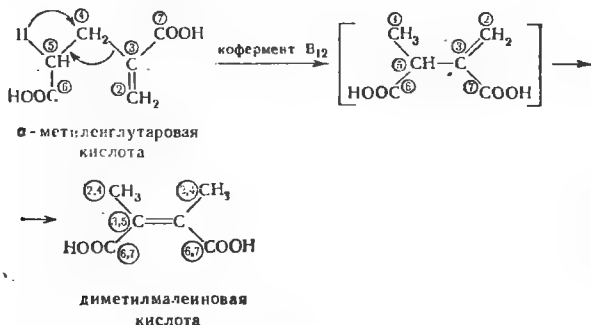
Следующая стадия заключается в переносе аминогруппы от С-6 β -лизина к С-5 с образованием 3,5-диаминогексаноата, который в последующем окисляется у С-3 до соответствующей 5-амино-3-оксокислоты. Превращение β -лизина в 3,5-диаминогексаноат катализируется β -лизинизомеразой, зависит от ДБК-кофермента и в общих чертах похоже на реакцию, катализируемую диолдегидратазой, так как здесь происходит перенос аминогруппы от С-6 к С-5 с одновременным переносом водорода в обратном направлении. Различие между этими реакциями заключается в химической природе переносимых групп и в том, что акцептирующий углеродный атом уже имеет одну окси-группу в реакции диолдегидратазы и не имеет ее в реакции превращения β -лизина в 3,5-диаминогексаноат. Подробно механизм изомеризации β -лизина и свойства фермента еще не изучены.

Рибонуклеотидредуктаза. Впервые связь между витамином B_{12} и синтезом дезоксирибозы в клетках *Lactobacillus leichmanii* была установлена в 1949 г., когда было показано, что один из дезоксирибонуклеотидов может заменять витамин B_{12} , необходимый для роста этого организма. В 1966 г. фермент, осуществляющий восстановление рибонуклеотидов до дезоксирибонуклеотидов, рибонуклеотидредуктаза, был получен в гомогенном состоянии [41]. Редуктаза проявляет абсолютную потребность в ДБК-коферменте и дигидролипоате. Фермент восстанавливает только рибонуклеозидтрифосфаты и лучшим субстратом для него является гуанозинтрифосфат, затем следуют инозин-, аденозин- и цитидинтрифосфаты. Молекулярный вес редуктазы 11 000. Ногенкамп показал, что рибонуклеотидредуктаза обладает аллостерическими свойствами и дезоксирибонуклеотиды являются высоко специфическими активаторами при восстановлении рибонуклеотидов [42].

Изучение механизма редуктазной реакции показало, что восстановление рибозильной части молекулы рибонуклеотидов заключается в замещении ОН-группы или С-2 на 1 атом водорода. Источником водорода является восстановленная липоевая кислота, причем водород переносится в виде гидридного иона с сохранением конфигурации у С-2 [43].

Редуктазная реакция подобна диолдегидратазной, так как обе они заключаются в замещении ОН-группы на 1 атом водорода. Эти реакции отличаются тем, что диолдегидратаза катализирует **внутримолекулярный** перенос водорода, тогда как редуктаза катализирует **межмолекулярный** перенос водорода от дигидролипота к 2-С дезоксирибозильной части продукта.

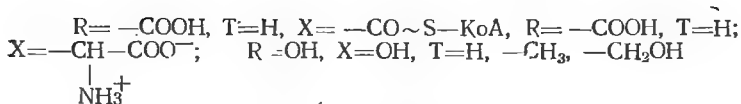
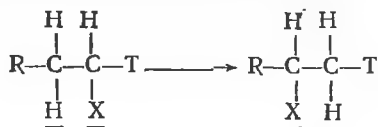
Превращение α-метилглютаровой кислоты в диметилмалеиновую кислоту. В 1970 г. Stadtman и др. сообщили о новой В₁₂-зависимой реакции изомеризации α-метилглютаровой кислоты в диметилмалеиновую кислоту [38]. Эти две кислоты являются промежуточными продуктами анаэробного сбраживания никотиновой кислоты до пропионата, ацетата, СО₂ и NH₃ у *Clostridium*. Предполагаемый механизм этой реакции представлен ниже. Водород от С-5 α-метилглютаровой кислоты перемещается к С-4, а остаток акрилата (углероды 2, 3 и 7) — к С-5. Перемещение водорода от С-5 к С-4 зависит от ДБК-кофермента. Перемещение двойной связи, которое должно иметь место при образовании диметилмалеиновой кислоты, требует второй протон-переносающей реакции, природа которой еще неизвестна. Как видно из предложенной схемы, эта реакция изомеризации подобна мутазным превращениям, описанным выше.



О механизме действия ДБК-кофермента

Изучение механизма реакций, зависимых от кобамидного кофермента, показало, что между ними нет принципиальных различий, и все они имеют общую природу. Все

реакции, требующие ДБК-кофермента, схематически могут быть представлены следующим образом:



Хотя природа R-, T- и X-групп может быть различна, однако все реакции заключаются в перемещении атома водорода. Кроме того, во всех случаях это перемещение происходит без обмена с водородом среды, стереоспецифическим образом. Водород может переноситься либо в виде гидрид-иона (диол-, глицеролдегидразные реакции, рибонуклеотидредуктазная), либо в виде протона (мутазные реакции).

В 1966 г. Wagner, Abeles и др. выдвинули гипотезу о прямом участии ДБК-кофермента в процессе переноса водорода в реакциях, для которых он является кофактором [44]. Эта гипотеза основывалась на изучении свойств комплекса апофермента диолдегидратазы с кобамидным коферментом. Оказалось, что такой фермент-коферментный комплекс способен реагировать с O_2 , гликольальдегидом и глиоксалем в неферментативной реакции (в отсутствие субстрата), в которой комплекс участвует как химический реагент, функционируя как донор и акцептор электронов. Известно, что свободный ДБК-кофермент не является ни восстановителем, ни окислителем. Однако под влиянием взаимодействия с белком изменяется химическая природа кофермента и он приобретает новые свойства, которыми не обладает в свободном состоянии. В этом заключается вся трудность в понимании механизма действия кобамидных коферментов, т. к. на основании знания химических свойств свободного ДБК-кофермента нельзя понять механизм действия его в каталитической реакции, как это имеет место в случае других известных коферментов (НАД, ФАД, пиридоксальфосфата и др.). В случае кобамидного кофермента, по-видимому, белку-апоферменту принадлежит исключительная роль, так как только благодаря взаимо-

действию с ним кофермент становится способным функционировать в каталитическом акте.

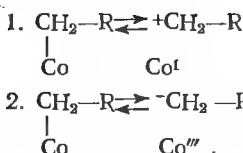
При изучении свойств комплекса аподиолдегидратазы с ДБК-коферментом и поведении этого комплекса в ферментативной реакции Вагнер и др. установили, что при взаимодействии апофермента с коферментом происходит расщепление Со-С-связи в молекуле кофермента и образование из него оксикобаламина и 5'-дезоксиаденозина. Основываясь на этих данных, авторы высказали предположение, что и в ферментативной реакции комплекс апофермента с ДБК-коферментом функционирует как донор и акцептор электронов, причем реакция начинается с расщепления Со-С-связи в молекуле кофермента в результате взаимодействия его с апоферментом.

Эта гипотеза получила экспериментальное подтверждение в 1966—1967 гг. [31, 45]. В опытах с диолдегидратазной системой при использовании меченного тритием у С-1 пропандиола было показано, что тритий переносится сначала на ДБК-кофермент, а затем обнаруживается в продукте реакции. После доказательства прямого участия кофермента в переносе водорода было установлено положение переносимого водорода в молекуле кофермента, а именно С-5'-положение. Вслед за диолдегидратазной реакцией были получены доказательства участия ДБК-кофермента как прямого переносчика водорода через С-5'-положение в мутазных [40], глицеролдегидратазной [46] и рибонуклеотидредуктазной реакциях [47].

При использовании химически синтезированного ДБК-кофермента, содержащего тритий в С-5'-положении, в мутазных, диол- и глицеролдегидратазных реакциях происходит перенос большей части метки (до 90%) на продукты реакции, что указывает на участие обоих атомов водорода метиленовой группы кофермента в реакциях. Однако в ДБК-коферменте эти атомы водорода стерически не эквивалентны. По-видимому, в течение ферментативной реакции происходит расщепление Со-С-связи и образование метильной группы в 5'-положении в качестве промежуточного продукта.

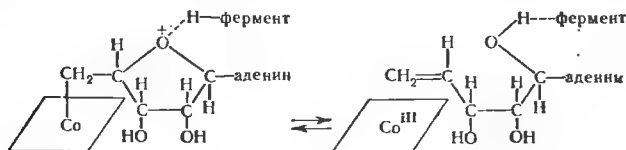
Таким образом, постулировано, что ферментативная реакция с участием кобамидного кофермента начинается с обратимой диссоциации Со-С-связи в результате взаимодействия ДБК-кофермента с апоферментом.

Диссоциация Со-С-связи в молекуле может происходить двумя путями:

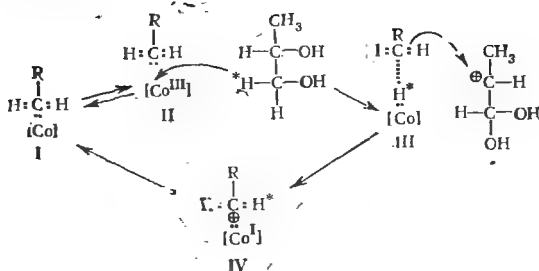


Первый случай, когда электронная пара этой связи остается с Co и в этом случае возникает обогащенный электронами витамин B_{12s} (Co^I) (кофермент может функционировать как донор электронов). Второй случай, когда электронная пара остается с аденозильной частью и образуется электронно-недостаточный витамин B_{12b} (Co^{III}). В этом случае ДБК-кофермент может служить акцептором электронов. Два типа диссоциации Co-C-связи лежат в основе способности ДБК-кофермента функционировать как донор и акцептор электронов.

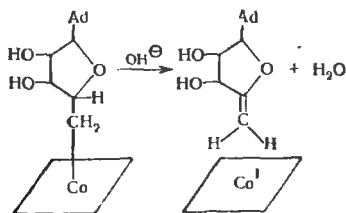
Нужно отметить, что относительно механизма диссоциации Co-C-связи под влиянием апофермента высказано несколько предположений, и этот вопрос остается нерешенным до настоящего времени [47, 48, 49]. Один из возможных механизмов расщепления Co-C-связи в молекуле ДБК-кофермента под влиянием апофермента представлен на схеме.



Согласно этой схеме, при взаимодействии фермента с кобамидным коферментом происходит расщепление Co-C-связи через протонирование рибозильного кислорода кофермента под влиянием какой-то (?) кислой группы фермента. При этом образуется комплекс, состоящий из электрофильного Co, который взаимодействует с двойной связью (вероятно, через π-комплекс) дезоксирибозильного остатка. Такой комплекс может функционировать как промежуточный гидридный акцептор в превращении пропандиола в пропионовый альдегид в диолдегидратазной реакции. Именно такой механизм предложен японскими авторами [50]. Согласно этому механизму, превращение пропандиола в пропионовый альдегид начинается с гетеролитического расщепления Co-C-связи в ДБК-коферменте при взаимо-



действии его с белком. При этом образуются связанные с апоферментом витамин B_{12b} (Co^{III}) и 5'-дезоксиаденозил-карбанион. Гидрид-ион переносится от C-1 субстрата к Co^{III} комплекса белка с коферментом, затем OH у C-2 смещается к C-1. Гидрид-ион от 5'-C состояния III, представляющего восстановленный кофермент-апоферментный комплекс, переносится к C-2 субстрата с последующей дегидратацией пропионового альдегида. Кофермент-апоферментный комплекс далее переходит обратно в состояние I через стадию IV, содержащую связанный с белком Co^I -кофермент и 5'-дезоксиаденозилный карбанион. Schrauzer и др. считают, что производные ДБК-кофермента с Co^{III} обладают незначительной активностью и способны принимать участие только в простых реакциях замещения, включающих аксиальные лиганды, или в электроно-транспортных реакциях [51]. В то же время производные корринов с Co^I значительно активнее в силу своей высокой нуклеофильности. Указанные авторы выдвигают гипотезу относительно Co^I -производных корринов как активных форм кофермента. Образование Co^I -производных кофермента может происходить путем β -элиминирования (отщепление атома водорода из β -положения рибозильного остатка кофермента) в результате взаимодействия кофермента с оксигруппой апофермента:



До сих пор говорилось о том, что диссоциация Со-С-связи в кобамидном коферменте под влиянием апофермента происходит гетеролитическим путем, когда пара электронов этой связи остается либо с атомом Со, либо с рибозильной частью. Большинство исследователей склонны предполагать именно такой характер диссоциации Со-С-связи, так как при гомолитическом расщеплении возникают корриновые производные с Co^{II} , которые менее реакционноспособны. Однако последние работы Vabioг и др. показали, что нельзя исключать возможность возникновения Co^{II} -корриноидов в процессе взаимодействия ДБК-кофермента с белком [52, 53]. В ходе ферментативной реакции, осуществляемой этаноламиндезаминазой в присутствии ДБК-кофермента и субстрата, и путем замораживания реакционной смеси до полного потребления субстрата авторы наблюдали появление сигнала ЭПР, характеризующегося g-фактором 2,09. Появление сигнала коррелировало с присутствием субстрата в среде; исчезновение сигнала наблюдалось при полном превращении субстрата в продукт. Появление сигнала ЭПР указывало на то, что в ходе ферментативной реакции появляется производное кофермента с неспаренными электронами (Co^{II}). Кроме того, снимая спектр комплекса фермента с ДБК-коферментом в ходе ферментативной реакции в области 500—400 нм через 20 сек. после добавления кофермента, авторы получили спектр, характерный для производного кофермента с Co^{II} . Эти данные поднимают вопрос о возможности гомолитического расщепления Со-С-связи в процессе этанолдезаминазной реакции.

Если это так, то, по-видимому, придется отказаться от единого механизма действия ДБК-кофермента для всех реакций, что маловероятно, принимая во внимание их общую природу. Во всяком случае, вопрос о гетеро- или гомолитическом разрыве Со-С-связи в молекуле кофермента под влиянием белка и о том, какова природа активированного кофермента, является кардинальным для понимания общего механизма действия V_{12} -зависимых ферментов.

Большое значение для понимания механизма действия кобамидного кофермента имеют исследования поведения аналогов и производных коферментов в различных реакциях, так как они дают возможность изучить взаимосвязь между химической структурой и биологической активностью ДБК-кофермента, а также оценить влияние различных лигандов на реактивность атома Со и поляризацию Со-С-связи.

В опытах со многими ферментами было показано, что оксо-, метил- и цианкобаламин при совместном добавлении с ДБК-коферментом оказывают конкурентное торможение, но будучи добавленными перед коферментом вызывают необратимую инактивацию ферментов [30, 35, 54]. Другие аналоги, которые вместо 5'-дезоксиаденозильного лиганда имеют алкильные, ацильные или другие 5'-дезоксинуклеозидные группы (5'-дезоксинуридил-, дезоксицитидил-), неактивны и даже тормозят V_{12} -зависимые реакции. Таким образом, установлено, что для коферментной активности необходима точная структура 5'-дезоксиаденозильной группы («нуклеозидного лиганда»). Однако некоторые модификации в дезоксиаденозильной группе позволяют получить более полную информацию относительно значения отдельных ее структурных элементов. Так, оказалось, что введение метильной группы в положение N^1 аденина приводит к полной потере активности, что говорит о незаменимой роли N^1 в каталитической функции кофермента [54]. Известно, что N^1 аденозина обладает наибольшей плотностью электронов и подвергается более легко протонированию. Возможно, что в ДБК-коферменте N^1 является центром присоединения кофермента к субстрату или к апоферменту, причем такое присоединение необходимо для его активности. Что касается NH_2 -группы аденина, то замещение в ней одного атома водорода на CH_3 -группу не уничтожает каталитической активности, хотя и резко ее снижает. Такое снижение каталитической активности может происходить за счет пространственного препятствия или увеличения основности аминогруппы.

Испытание 2'-дезоксиде- и 3'-дезоксиаденозиновых аналогов ДБК-кофермента показало, что эти аналоги образуют активные комплексы с апоферментом с такой же величиной константы Михаэлиса K_M , что и кофермент. Однако $V_{\max}$ у этих аналогов на порядок ниже, чем у ДБК-кофермента [55]. Это различие объясняется тем, что замещение OH -группы на водород в 2'- и 3'-положениях вызывает изменения конформации рибофуранозного кольца, которые могут косвенно влиять на поляризацию $Co-C$ -связи, необходимую для функционирования кофермента. Японские авторы в системе диолдегидратазы испытали аналог ДБК-кофермента, у которого введен Cl в положение 10 корринового кольца [50]. K_M у аналога и кофермента были одинаковы, что указывало на одинаковое их сродство к апоферменту, но $V_{\max}$ у аналога была значительно ниже. Установлено,

что Со-С-связь в аналоге более прочная, чем в коферменте; она поляризована по направлению к атому Со, что является менее удобным для ее диссоциации, которая необходима для проявления коферментной активности.

Работами Brodie было показано, что присутствие 5,6-диметилбензимидазола в качестве «нижнего» аксиального лиганда в кобаламинах или его отсутствие (как это имеет место в кобинамидах) значительно влияет на активность атома Со и лабильность Со-С-связи в корриноидах [54]. Видимо, сильный лиганд в «нижнем» аксиальном положении втягивает атом кобальта в плоскость корринового ядра и создает тем самым стерическое препятствие для реакции Со^I-кобаламинов с алкилгалогенидами. В противоположность этому в кобинамидах, у которых отсутствует этот лиганд, атом кобальта локализован выше плоскости корринового кольца и реакция с вторичными алкилгалогенидами протекает легко.

На основании изучения полярографического поведения некоторых кобаламинов и кобинамидов были получены дополнительные доказательства того, что природа лигандов, связанных с атомом Со в «верхнем» или «нижнем» координационном положении, оказывает глубокое влияние на реакционную способность атома кобальта [55]. Hogenkamp и Holmes постулируют, что в течение ферментативных реакций, протекающих с участием кобамидного кофермента, координационная связь между 5,6-диметилбензимидазолом открывается и закрывается [55]). Так, в реакциях, включающих перенос гидридного иона (диол-, глицеролдегидратазные, рибонуклеотидредуктазная), раскрытие координационной связи предшествует и облегчает гетеролитическое расщепление Со-С-связи с образованием 5'-дезоксиаденозилкарбаниона и нуклеофильного Со^I-кобаламина (рис. 76, состояние II).

После того как 5'-дезоксиаденозилкарбанион примет Н⁺ от субстрата, дальнейший перенос этого гидридного иона облегчается повышением нуклеофильности атома Со. Закрывание координационной связи между 5,6-диметилбензимидазолом должно повышать нуклеофильность металла (состояние IV).

В реакциях, в которых осуществляется, по-видимому, перенос протона, а не гидрид-иона (мутазные реакции), гетеролитическое расщепление Со-С-связи с образованием 5'-дезоксиаденозилкарбаниона и электрофильного Со^{III}-кобаламина происходит без разрыва координационной связи с

5,6-диметилбензимидазолом. Наоборот, сохранение этой связи стабилизирует Co^{III} -кобаламин (состояние V). После того как 5'-дезоксиаденозилкарбанион присоединит протон, перенос водорода к акцептирующей молекуле облегчается тем, что Co становится более электрофильным. Раскрытие координационной связи повышает электрофильность Co (состояние VII); после того как произойдет перенос прото-

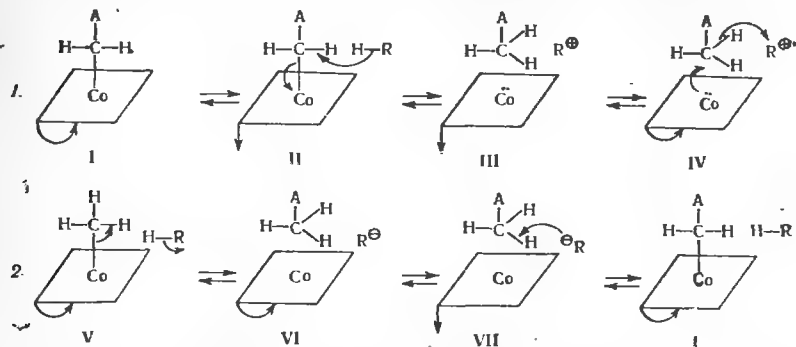


Рис. 76. Постулированный механизм переноса гидридного иона (1) и протона (2).

A — аденин; HR — субстрат; стрелки от квадратов вниз показывают открытие и закрытие координационной связи между Co и нижним лигандом.

на на акцептирующую молекулу, координационная связь вновь закрывается (состояние I).

Открытие и закрытие координационной связи между 5,6-диметилбензимидазолом и атомом Co в процессе переноса метильной группы метионинсинтетазой предполагают авторы работы [5]. На основании изучения спектральных свойств метионинсинтетазы в процессе ее метилирования эти авторы считают, что гистидиновые остатки фермента могут эффективно конкурировать с 5,6-диметилбензимидазолом за кобальт и в процессе акцептирования и переноса метильной группы происходит соответственно закрытие и открытие гистидин-Co-координационной связи. Эти данные представляют несомненный интерес, так как по существу являются первыми и до сих пор единственными, относящимися к функциональным группам белка. Нужно отметить, что, за исключением сведений относительно SH-групп апофермента, которые, по-видимому, участвуют в связывании кофермента, практически отсутствует информация о функциональных группах апоферментов, о строении субстрат- и коферментсвязывающих участков.

Заканчивая рассмотрение механизма действия кобамидного кофермента, можно констатировать, что на сегодняшний день общепринятым является положение о том, что во всех реакциях ДБК-кофермент служит прямым переносчиком водорода от субстрата на продукт реакции и что необходимым условием для такого переноса является разрыв Со-С-связи в коферменте. Однако, в чем заключается активация кофермента под влиянием белка, каким образом происходит этот разрыв Со-С-связи, какова природа активированного кофермента и что происходит при этом с апоферментом — все эти вопросы ждут своего дальнейшего исследования.

В последнее время намечаются пути исследования этих проблем. Появляется все больше доказательств в пользу представления о гомолитическом механизме разрыва Со-С-связи не только в случае этаноламиндезаминазной реакции. Так, при изучении рибонуклеотидредуктазы методом ЭПР обнаружен Co^{II} при взаимодействии ДБК-кофермента; апо-рибонуклеотидредуктазы, дигидролипоата и нуклеозидтрифосфата. Структура спектра ЭПР находится в известной зависимости от природы субстрата и аллостерического активатора реакции — дезоксинуклеозида. Образование в ходе реакции витамина B_{12r} (Co^{II}) было подтверждено также с помощью электронных спектров [56]. Аналогичные результаты были получены при исследовании глицеролдегидратазы [57]. Таким образом, это еще раз подтверждает общность химического механизма различных реакций, катализируемых B_{12} -зависимыми ферментами.

Активно продолжаются исследования роли структурных элементов кофермента B_{12} в механизме связывания с апоферментом и в каталитическом действии. При изучении аналогов ДБК-кофермента, модифицированных по агликону нуклеозидного лиганда, было установлено, что замещения в N(6)-положении остатка аденозина приводят к потере коферментной активности, однако способность к связыванию с апоферментом глицеролдегидратазы остается высокой (константа диссоциации имеет величину порядка 10^{-7} М) — модифицированные аналоги ДБК являются мощными конкурентными ингибиторами. Аналогичные результаты получены при замене аденозильного остатка на уридилный и цитидильный [58].

В последнее время детально исследуются кинетика и механизм образования холофермента из апо- и кофермента. Как указывалось выше, при обычных условиях в этом слу-

чае происходит потеря ферментативной активности. Кинетические исследования показали, что инактивация глицеролдегидратазы является мономолекулярной реакцией. Величина константы скорости инактиваций (k_1) зависит от условий процесса. В аэробных условиях и при температуре 37° k_1 составляет $0,42 \text{ мин.}^{-1}$, при концентрации кислорода, измеримой с концентрацией фермента, k_1 снижается до $0,125 \text{ мин.}^{-1}$ и при полном удалении кислорода достигает весьма малой практически не определяемой величины. Большое влияние на k_1 оказывает присутствие субстрата и его химическая природа. Так, глицерин, этиленгликоль и 1,2-пропандиол снижают величину константы скорости инактивации глицеролдегидратазы до значений 0,35; 0,19 и $0,046 \text{ мин.}^{-1}$ соответственно. Защитным действием обладают также диолы, являющиеся не субстратами, а конкурентными ингибиторами глицеролдегидратазы. Так, например, метиловый эфир глицерина снижает k_1 до значения $0,05 \text{ мин.}^{-1}$ [59]. Аналогичные результаты были получены ранее при исследовании диолдегидратазы: 1,2-бутандиол, не являясь субстратом, оказался способным защищать холофермент от инактивации [60].

Специальную роль в механизме взаимодействия ДБК-кофермента с апоферментом играют одновалентные катионы. Давно установлено, что в отсутствие ионов K^+ и NH_4^+ V_{12} -зависимые ферменты не проявляют активности и, наоборот, ионы Na^+ и Li^+ являются ингибиторами. Причины такого действия катионов пока не вполне ясны. Что касается глицеролдегидратазы, то установлено, что активирующие катионы способствуют ассоциации двух субъединиц апофермента, необходимой для взаимодействия с коферментом. Инактивирующие катионы, наоборот, вызывают диссоциацию субъединиц [61].

Исследованиями Fukui и соавторов [62] было недавно установлено, что ионы K^+ и NH_4^+ играют важную роль в образовании холофермента диолдегидратазы и комплексов апофермента с аналогами ДБК-кофермента. Вместе с тем было найдено, что ионы K^+ не влияют на необратимую реакцию образования комплекса с оксикобаламином.

При исследовании в нашей лаборатории глицеролдегидратазы было установлено, что K^+ , NH_4^+ и Tl^+ , имеющие близкие значения ионного радиуса, являются активаторами фермента, а ионы Na^+ и Li^+ не обладают кофакторной активностью (в отличие от данных Fukui для диолдегидра-

тазы, согласно которым ион Na^+ обладает активностью, хотя и меньшей в 2 раза, чем K^+).

Из этих данных следует, что при формировании участка апофермента, необходимого для образования активированного комплекса белок—кофермент—субстрат, обязательной является конформационная перестройка белка, по-видимому, по механизму, постулированному М. М. Шемякиным и Ю. А. Овчинниковым [63]. Можно предполагать, что в молекуле глицеролдегидратазы имеются полипептидные участки, способные к образованию браслетных структур как с ионами, имеющими радиус 1,3—1,4 Å (K^+ , NH_4^+ , Tl^+), так и с ионами, имеющими радиус 0,1—1,0 Å (Na^+ , Li^+). В первом случае образуется активный центр, во втором не образуется.

Изучение влияния одновалентных катионов на инактивацию холофермента показало, что защитным действием обладают ионы обоих типов, но в разной степени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kisliuk R., Woods D. *Biochem. J.*, 1964, **75**, 467.
2. Buchanan J., Elford H. et al. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1964, **112**, 756.
3. Dickerman H., Redfield B. et al. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1964, **112**, 791.
4. Guest I., Friedman S., Dilworth M., Woods D. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1964, **112**, 774.
5. Taylor R., Weissbach H. *J. Biol. Chem.*, 1967, **242**, 1502.
6. Stavrianopoulos I., Jaenicke L. *Europ. J. Biochem.*, 1967, **3**, 95.
7. Estel R., Brot N., Taylor R., Weissbach H. *Arch. Biochim. Biophys.*, 1968, **126**, 353.
8. Taylor R., Weissbach H. *J. Biol. Chem.*, 1967, **242**, 1509.
9. Taylor R., Weissbach H. *Arch. Biochim. Biophys.*, 1968, **125**, 240.
10. Rudiger H., Jaenicke L. *Febs letters*, 1968, **1**, 5, 293.
11. Taylor R., Weissbach H. *Arch. Biochim. Biophys.*, 1969, **129**, 728.
12. Taylor R., Hanna M. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 1970, **38**, 758.
13. Taylor R., Hanna M. *Arch. Biochim. Biophys.*, 1970, **139**, 149.
14. Taylor R., Weissbach H. *Arch. Biochim. Biophys.*, 1969, **129**, 745.
15. Taylor R., Weissbach H. *J. Biol. Chem.*, 1967, **242**, 1517.
16. Stadtman E., Blaylock D. *Feder. Proc.*, 1966, **27**, 1657.
17. Wood J., Wolf R. J. *Bacteriol.*, 1966, **92**, 696.
18. Poston J., Kuratonik E., Stadtman E. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1964, **112**, 804.
19. Zjungdahl L., Glatzle D., Goodyear J., Wood H. *Abstr. Pap. Am. Soc. Microbiol. Meet. N. — Y.*, 1967.
20. Hogenkamp H. *Ann. Rev. Biochem.*, 1968, **37**, 225.
21. Barker H., Suzuki F. *Ann. N. — Y. Acad. Sci.*, 1964, **112**, 644.
22. Sprecher M., Switzer R., Sprinson D. *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 864.
23. Wood H., Kellermeyer R., Stijerhold R. *Ann. N. — Y. Acad. Sci.*, 1964, **112**, 661.

24. Suzuki F., Barker H. J. Biol. Chem., 1966, 241, 878.
25. Switzer R., Barker H. J. Biol. Chem., 1967, 242, 2658.
26. Wagner F. Ann. Rev. Biochem., 1966, 35, 405.
27. Cannata J., Focesi A. et al. J. Biol. Chem., 1965, 240, 3249.
28. Abeles R., Lee H. J. Biol. Chem., 1961, 236, 2347.
29. Zagalak B., Pawelkiewicz J. Acta Biochim. Polon., 1964, 11, 49.
30. Kaplan B., Stadtman E. J. Biol. Chem., 1968, 243, 1787.
31. Rety J., Umani-Ronchi A., Aragoni D. Experientia, 1966, 22, 502.
32. Zagalak B., Frey R. et al. J. Biol. Chem., 1966, 241, 3028.
33. Rety J., Aragoni D. Experientia, 1966, 22, 783.
34. Zagalak B. Bull. Acad. Polon. sci. Ser. sci. biol., 1968, 16, 67.
35. Lee H., Abeles R. J. Biol. Chem., 1963, 238, 2367.
36. Schneider Z., Pawelkiewicz J. Acta Biochim. Polon., 1966, 13, 311.
37. Stroinski A., Schneider Z., Pawelkiewicz J. Bull. Acad. Pol. sci., 1967, 15, 727.
38. Kung H., Cederbaums., Tsai L., Stadtman T. Proc. Nat. Acad. Sci., 1970, 65, 978.
39. Babior B., Li Ting Kai. Biochemistry, 1969, 8, 154.
40. Barker H. Biochem. J., 1967, 105, 1.
41. Goulman M., Beck W. J. Biol. Chem., 1966, 241, 4233.
42. Hogenkamp H. Biochem. J., 1967, 103, 5c.
43. Batterham T., Ghambeer R., Blakley R. et al. Biochemistry, 1967, 6, 1203.
44. Wagner O., Lee H., Frey P., Abeles R. J. Biol. Chem., 1966, 241, 1751.
45. Abeles R., Frey P. Federat. Proc., 1966, 25, 1639.
46. Zagalak B. Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. sci. biol., 1968, 16, 67.
47. Hogenkamp H., Ghambeer R. et al. J. Biol. Chem., 1968, 243, 799.
48. Miller W., Richards I. J. Am. Chem. Soc., 1969, 91, 1498.
49. Frey P., Essenberg M., Abeles K. J. Biol. Chem., 1967, 242, 5369.
50. Tamao Y., Morikawa Y. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 151, 260.
51. Schrauzer G., Sibet J. J. Am. Chem. Soc., 1970, 92, 1022.
52. Babior B. Biochim. Biophys. Acta, 1969, 178, 406.
53. Babior B., Gould D. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1970, 38, 758.
54. Brodie J. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1969, 62, 46.
55. Hogenkamp H., Holmes S. Biochemistry, 1970, 9, 1887.
56. Yamado R., Tamao Y., Blakley R., Biochemistry, 1971, 10, 3959.
57. Cockle S., Hill H., Williams R., Davies S., Foster M. J. Am. Chem. Soc., 1972, 94, 275.
58. Яковлев В. А., Познанская А. А., Просвстова Н. К., Рудакова И. П., Поспелова Т. А., Юркевич А. М. Докл. АН СССР, 1971, 197, 230.
59. Познанская А. А., Корсоев Т. Л., Малахов А. А., Яковлев В. А. Вopr. мед. химии, 1972, 17, 145.
60. Toraya T., Fukui S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, 36, 469.
61. Schneider Z., Pech K., Pawelkiewicz J. Bull. Acad. Polon. Sci., 1966, 14, 7.
62. Toraya T., Sugimoto Y., Tamao Y., Shimizu S., Fukui S. Biochemistry, 1971, 10, 3475.
63. Шемякин М. М. Журн. Всес. химич. общества им. Д. И. Менделеева, 1971, 16, 122.

Г Л А В А V

ДОПОЛНЕНИЕ

РОЛЬ ОСТАТКОВ ЦИСТЕИНА В МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ АЛЬДОЛАЗЫ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ КРОЛИКА

Г. САБОЛЧИ, В. ЖАЯНИ, Е. БИШКУ, М. САМГО

*Институт биохимии Венгерской академии наук,
Будапешт*

В нашей лаборатории в течение ряда лет проводится исследование активного центра, а также первичной структуры альдолазы. Наиболее обычный метод изучения активного центра фермента заключается в химической модификации боковых цепей аминокислот. Было, однако, показано, что данные, получаемые при этом, требуют осторожной интерпретации. Химическая модификация остатков отдельных аминокислот может вызывать значительные изменения в конформации фермента [1, 2, 3]. В данной работе представлены результаты, полученные при изучении активного центра альдолазы, и рассмотрены проблемы, которые встречаются при интерпретации такого рода данных.

Молекула альдолазы состоит из 4 субъединиц [4, 5]. По-видимому, 2 из них идентичны, а 2 другие несколько отличаются друг от друга [6, 7]. Механизм действия альдолазы был изучен Rose и сотрудниками [8, 9]. В настоящее время известно, что в ходе катализа диоксиальдегидофосфат активируется путем промежуточного образования карбаниона, а оксогруппа ацетоновой части образует шиффово основание с ϵ -аминогруппой остатка лизина. Этот остаток был специфически модифицирован в лаборатории Хорекера и была определена аминокислотная последовательность в области этого остатка [10].

С целью определения строения активного центра альдолазы и выяснения механизма ее действия было предпринято много попыток. Однако до сих пор отсутствуют однозначные данные. Работы, проведенные в различных лабораториях, свидетельствуют об определенной роли С-концевого остатка тирозина [11]. Удаление этого остатка путем переваривания карбоксипептидазой привело к образованию

производного фермента, обладавшего 5% исходной активности, но величиной K_M (по отношению к фруктозодифосфату) такой же, как и K_M нативного фермента. Альдолаза, обработанная карбоксипептидазой, по свойствам сходна с транс-альдолазой, так как способна катализировать перенос остатка диоксиальдегидфосфата к акцепторам альдегида.

Используя метод химической модификации, мы получили данные, свидетельствующие о наличии в альдолазе существенных остатков гистидина и тирозина [12, 13]. Последний, по-видимому, не является С-концевым тирозином. Реагенты, модифицирующие остатки гистидина и тирозина, действуют на большое количество этих остатков, причем ни в одном из проведенных исследований не было определено, изменяется ли конформация фермента при фотоокислении и ацетилировании.

Другой боковой цепью, которую длительное время считали участвующей в катализе, являются остатки цистеина. Однако данные, полученные химической модификацией, являются спорными. Действием п-меркурибензоата можно блокировать 10 SH-групп альдолазы без потери активности. Однако последующее блокирование еще нескольких SH-групп приводит к инактивации фермента [2, 14].

Ранее было показано, что блокирование наиболее реакционноспособных SH-групп альдолазы п-меркурибензоатом изменяет конформацию фермента [2]. Вследствие этой структурной модификации другие SH-группы становятся доступными действию реагента.

Альдолаза, в которой блокировано 10 SH-групп, полностью активна, хотя структура фермента заметно изменена. Показано различными методами, что ее структура более беспорядочна, чем структура нативной альдолазы [2]. Это указывает на то, что блокирование тех SH-групп, которые легко доступны действию ингибитора, не изменяет структуру субстратсвязывающего участка. Более того, связывание субстрата или неорганического фосфата с модифицированным ферментом восстанавливает структуру, которая становится сходной со структурой нативного фермента. Это подтверждается наличием полной активности альдолазы, в которой блокировано 10 SH-групп.

На рис. 77 показана ферментативная активность производных альдолазы, а также их способность гидролизоваться под действием трипсина в зависимости от количества блокированных SH-групп [2]. Способность гидролизовать-

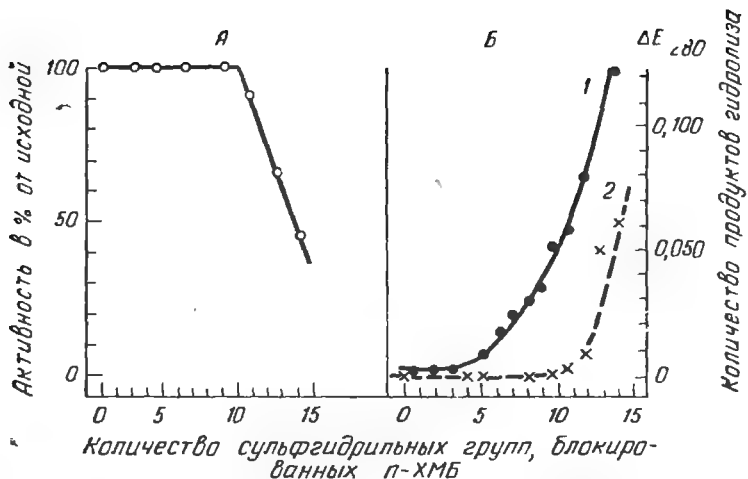


Рис. 77. Зависимость активности альдолазы и ее способности подвергаться триптическому гидролизу от числа сульфгидрильных групп, блокированных п-ХМБ.

Триптический гидролиз в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,5 при 25°. Концентрация трипсина $2,6 \times 10^{-4}$ [TE] Нб/мл.

А — изменение активности; Б — способность к триптическому гидролизу; 1 — отсутствие фруктозадифосфата; 2 — в присутствии фруктозадифосфата.

ся возрастает пропорционально числу блокированных SH-групп. Активность альдолазы не меняется при введении в фермент до 10 остатков п-меркурибензойной кислоты. Активность падает, если более 10 остатков цистеина блокированы ингибитором. В присутствии фруктозофосфата альдолаза, содержащая до 10 блокированных SH-групп, устойчива к протеолизу даже при высоких концентрациях трипсина.

Тот факт, что модификация некоторых (но не наиболее реакционноспособных) SH-групп приводит к инактивации фермента, является источником большого беспокойства для биохимиков, изучающих альдолазу. Kowal с сотрудниками показали, что примерно 12 SH-групп альдолазы можно блокировать хлординитробензолом при pH 9,6 с одновременной инактивацией [19]. Эти авторы предполагают, что SH-группы, защищенные субстратом, локализованы в области субстратсвязывающего участка фермента.

Мы предприняли исследование в этом направлении с целью определения остатков цистеина, участвующих в ка-

тализе. При использовании в качестве блокирующего агента C^{14} -бромуксусной кислоты были найдены условия избирательного карбоксиметилирования примерно 10 SH-групп.

На рис. 78 показано падение активности, а также введение карбоксиметильных групп во времени при различных значениях рН. Видно следующее:

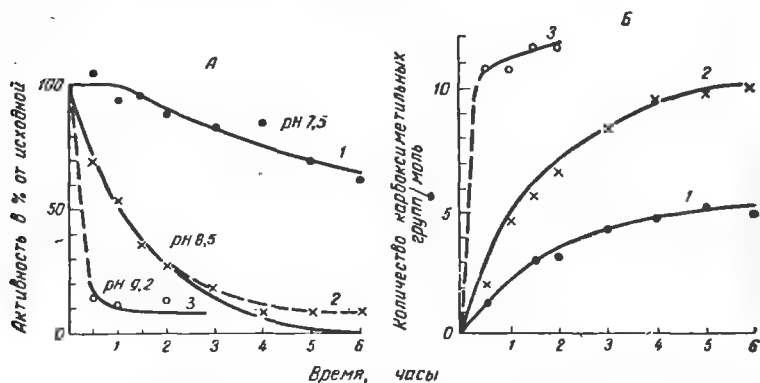


Рис. 78. Зависимость скорости реакции алкилирования альдолазы бромацетатом $[C^{14}]$ от рН. Концентрация: белка $6,4 \cdot 10^{-5}$ М, бромацетата $1 \cdot 10^{-2}$ М.

А — изменение активности; Б — количество карбоксиметильных групп на молекулу альдолазы; 1 — рН 7,5; 2 — рН 8,5; 3 — рН 9,2.

— некоторые остатки цистеина могут быть алкилированы без потери активности;

— период индукции в ходе инактивации позволяет предположить, что алкилирование различных SH-групп является реакцией, протекающей в несколько стадий;

— карбоксиметилирование 10 SH-групп на 1 моль фермента приводит к почти полной инактивации альдолазы. Фермент, который содержит 10 карбоксиметилированных SH-групп (обозначаемый далее как 10-КМ-альдолаза), обладает примерно 10% активности от исходной. Карбоксиметильные группы связаны только с остатками цистеина. Еще не установлено, неактивна ли 10-КМ-альдолаза полностью, или это частично инактивированный фермент, имеющий некоторую остаточную активность, подобную активности альдолазы, обработанной карбоксипептидазой (КП-альдолаза) или трипсином (альдолазой-Т) [11, 16, 17].

Так как альдолаза состоит из 4 субъединиц, образование 10 остатков КМ-цистеина указывает на карбоксиметилирование 3 групп остатков цистеина.

На рис. 79 показана кривая зависимости активности от числа карбоксиметильных групп, связанных с ферментом

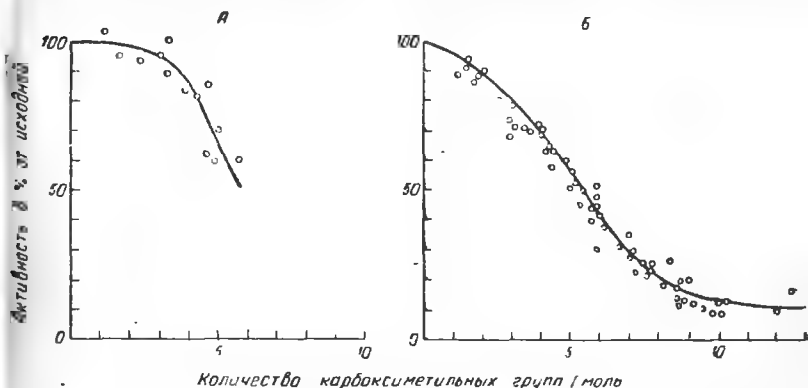


Рис. 79. Зависимость активности альдолазы от степени карбоксиметилирования. А — pH 7,5; Б — pH 8,5.

при pH 7,5. Можно видеть, что 4 остатка цистеина могут быть алкилированы без уменьшения активности. Мы назвали эту группу остатков цистеина — цистеин-I. При pH 8,5, где алкилирование остатков цистеина проходит глубже, картина осложняется, но S-образная форма кривой указывает на различие в реакционной способности SH-групп и на различное их участие в каталитическом процессе. Форма этой кривой также показывает, что для проявления активности не требуются остатки группы цистеина-I; более того, это дает возможность предположить, что для проявления активности не требуется и группа остатков цистеина-III. Следует предположить, что алкилирование цистеиновых остатков группы цистеин-II сопровождается инактивацией фермента.

Кинетический анализ такого процесса алкилирования представляет некоторые трудности, так как независимо можно определить лишь константу скорости алкилирования остатков цистеина-I. Константа скорости алкилирования остатков цистеина-II была рассчитана из зависимости скорости инактивации от времени, считая, что алкилирование остатков цистеина-II является причиной инактивации. На рис.

80 показано первое приближение графического решения реакции карбоксиметилирования. В зависимости от концентрации бромуксусной кислоты карбоксиметилирование остатков цистеина-II и цистеина-III начинается на более ранней или более поздней стадии реакции. Данные, полученные при исследовании производных альдолазы, содержащих 4, 8 или 12 остатков КМ-цистеина, подтверждают высказанное ранее предположение о том, что эти остатки цистеина в

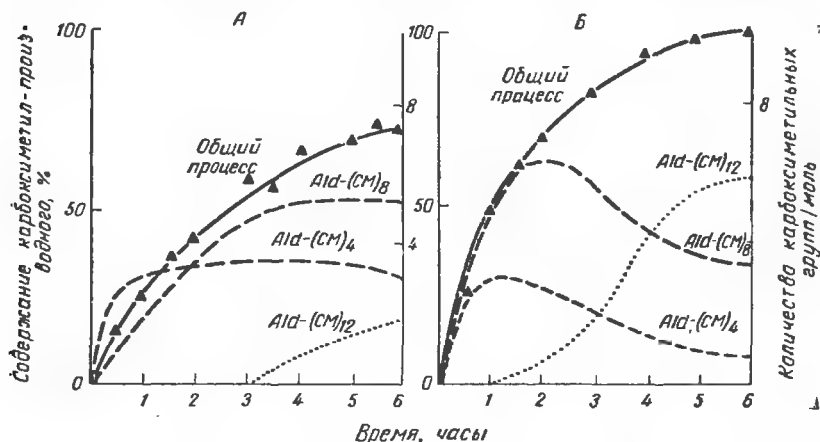


Рис. 80. Образование карбоксиметильных производных альдолазы в ходе реакции алкилирования. Концентрация бромацетата: $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (А), $1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ (Б); Ald = (СМ)_п — производные альдолазы, содержащие п карбоксиметильных групп (п = 4, 8, 12).

КМ-альдолазе распределены в равной степени во всех 4 полипептидных цепях — предположение, которое не было еще доказано. Анализ этих данных позволяет предсказать, что на ранней стадии карбоксиметилирования будет реагировать только один остаток цистеина на 1 субъединицу, а производное, содержащее 10 КМ-групп, будет давать при гидролизе 3 радиоактивных пептида. Это предположение было подтверждено путем анализа.

Ранее было показано, что в присутствии фосфата и дифосфата фруктозы конформация нативной альдолазы изменяется. Поэтому было проведено алкилирование альдолазы при pH 8,5 — в присутствии дифосфата фруктозы или фосфата. Можно было предположить, что в присутствии субстрата или фосфата остатки цистеина-II не будут алки-

лироваться; действительно было обнаружено, что как фруктозадифосфат, так и фосфат препятствуют алкилированию.

На рис. 81 показано, что в присутствии фосфата даже при pH 8,5 4-КМ-группы могут быть введены в альдолазу, практически без потери активности. В дальнейшем это вещество будет обозначено 4-КМ-альдолазой.

Чтобы определить, какие остатки цистеина были карбоксиметилированы, образцы неактивной 10-КМ- и активной 4-КМ-альдолазы были обработаны трипсином и изучены пептидные карты. В качестве контроля использовали триптический гидролизат альдолазы, полностью карбоксиметилированной в мочеvine (рис. 82). Авторадиограмма двумерного электрофореза образца полностью карбоксиметилированной альдолазы содержит 6 пятен пептидов, в каждом из которых присутствует КМ-цистеин.

При хроматографии в системе растворителей, содержащей амилловый спирт, пятно N_1 разделяется на 2 пятна. Таким образом, в целом альдолаза содержит 7-КМ-цистеинилпептидов. На рис. 83 показаны радиоактивные пептиды 10-КМ- и 4-КМ-альдолазы. В активной 4-КМ-альдолазе только один пептид — В содержит большое количество радиоактивной метки, т. е. карбоксиметилируется 1 остаток цистеина на 1 субъединицу. Неактивная 10-КМ-альдолаза содержит 2 пятна с высокой радиоактивностью — пептид В и N_{11} , радиоактивность 3-го пептида весьма мала. Это свидетельствует о том, что в ходе карбоксиметилирования пептид В реагирует гораздо более быстро, чем пептиды N_{11} и N_{12} . Следует отметить, что этот результат хорошо согласуется с данными, полученными кинетическим анализом.

Так как включение метки в пептид В происходит как в присутствии, так и в отсутствие фосфата, его остаток цистеина должен быть расположен на поверхности белка. Блокирование этого остатка не влияет на активность фер-

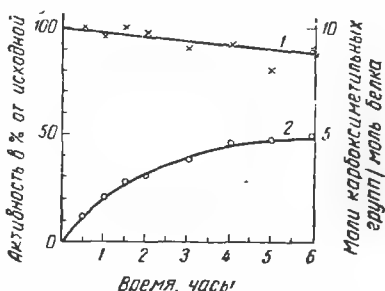
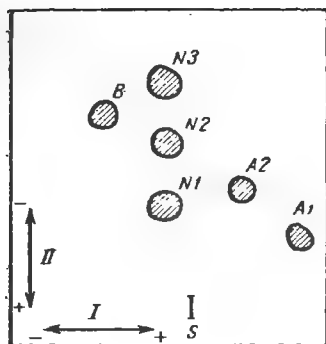
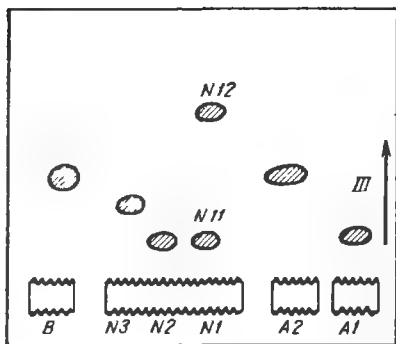


Рис. 81. Реакция алкилирования альдолазы бромацетатом $[C^{14}]$ в присутствии фосфата. Концентрация: белка $6,4 \cdot 10^{-5}$ М, бромацетата $1 \cdot 10^{-2}$ М. Трис-буфер pH 8,5 $I = 0,1$, содержащий 0,07 М фосфата.

1 — активность фермента; 2 — радиоактивность.



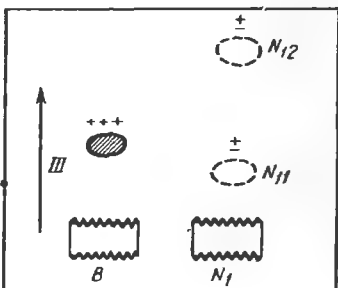
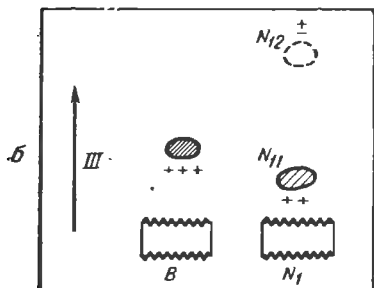
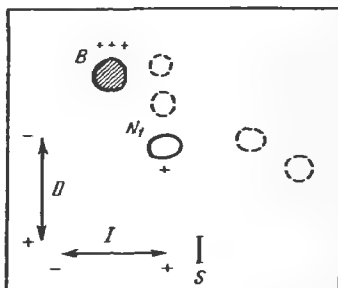
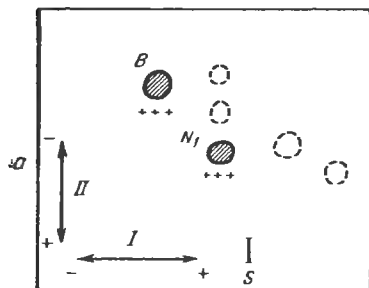
а



б

Рис. 82. Радиоактивные КМ-С¹⁴ — цистеинсодержащие пептиды триптического гидролизата альдолазы, карбоксиметилированной в присутствии мочевины.

а — двумерный электрофорез триптического гидролизата при pH 6,5 (I) и pH 2,1 (II); б — радиоактивные пятна, обнаруженные на электрофореграммах, были вырезаны, вещества перенесены на другой лист бумаги и хроматографированы в системе изоамиловый спирт — пиридин — вода (III).



10-КМ-альдолаза

4-КМ-альдолаза

Рис. 83. Радиоактивные КМ-С¹⁴-цистеинсодержащие пептиды триптического гидролизата производных альдолазы 10-КМ и 4-КМ. Гидролизаты обрабатывали так, как указано в подписи к рис. 82.

мента, он соответствует цистеиновым остаткам, который мы назвали цистеин-I. Из этого следует, что блокирование остатка цистеина пептида N₁₁ (цистеин-II) является причиной инактивации. Слабое включение метки, найденное в пептиде N₁₂, дает возможность предположить, что остаток цистеина этого пептида принадлежит к группе цистеин-III. По-видимому, пептиды В и N₁₁ присутствуют в каждой субъединице альдолазы, однако нет уверенности в том, что каждая субъединица содержит пептид N₁₂.

Из триптического гидролизата альдолазы были выделены пептиды, содержащие остатки цистеина. Аминокислотный состав и частичная последовательность пептидов В, N₁₁ и N₁₂ приведены ниже. Пептид В, возможно, идентичен пептиду триптического гидролизата, содержащему остаток лизина, который участвует в образовании шиффового основания с диоксиацетонфосфатом [10]. Следует отметить, что остаток цистеина, который находится в непосредственной близости к активному остатку лизина, может быть блокирован без потери ферментативной активности. Пептид N₁₁,

Пептиды триптического гидролизата селективно карбоксиметилированной (KM) альдолазы, содержащие остатки KM (C¹⁴)-цистеина

Пептид	Частичная последовательность пептида
N ₁₁	Ала—лей—ала—KM—цис ¹ —сер(асн ₁ —гли ₁ —гли ₁ —ала ₁ —лей ₁ —лиз
В	Ала—лей—сер(гис ₂ —асх ₁ —илей ₁ —тир ₁) (асх ₁ —трео ₁ —длх ₁ —про ₁ —гли ₁ —лей ₃ —лиз ₁) мет—вал—трео—про(гис ₁ —KM-цис ₁ —трео ₁ —гли ₁ —гли ₁ —ала ₁) лиз
Пептид, содержащий остаток реактивного лизина	Ала—лей—сер(гис ₂ —асн ₁ —илей ₁ —тир ₁) (аси ₁ —трео ₁ —гли ₁ про ₁ —гли ₁ —лей ₃ —лиз ₁ ²) мет—вал—трео—про(гис ₁ —KM-цис ₁ —трео ₁ —гли ₁ —гли ₁ —ала ₁)—лиз
N ₁₂	KM-цис(про ₂ —лей ₂ —трео ₁)—лиз

¹ KM-(C¹⁴)-цистеинил.

² Остаток лизина, образующий шиффово основание [10].

содержащий остаток цистеина-II, является более коротким пептидом.

В нашей лаборатории проводится работа по определению общей аминокислотной последовательности альдолазы. При обработке бромцианом полипептидная цепь альдолазы расщепляется на 4 фрагмента, которые были разделены. В этих фрагментах было определено местоположение остатков цистеина (рис. 84). Можно видеть, что остатки цистеина-II и цистеина-III расположены в С-концевом фрагменте.

Если химическая модификация приводит к инактивации фермента, а в присутствии субстрата инактивации не про-

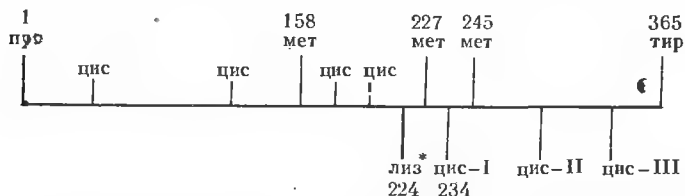


Рис. 84. Распределение остатков цистеина в полипептидной цепи альдолазы, полученное на основании анализа бромцианового гидролизата.

исходит, обычно предполагают, что при такой модификации затрагивается субстратсвязывающий участок фермента. Таким примером является карбоксиметилирование остатков цистеина-II в альдолазе. Однако мы понимали, что это предположение должно быть проверено экспериментально. Поэтому мы избрали не прямой метод, заключающийся в следующем. Мы измерили скорость тепловой денатурации образцов 10-КМ-альдолазы в присутствии и в отсутствие фруктозадифосфата и фосфата. В том случае, если карбоксиметилирование затрагивает субстратсвязывающий участок, можно ожидать, что присутствие субстрата не будет препятствовать тепловой денатурации. Неожиданно мы обнаружили, что 10-КМ-альдолаза защищалась фосфатом и фруктозадифосфатом (рис. 85), что свидетельствует о завязывании субстрата 10-КМ-альдолазы так же, как и неорганического фосфата. 10-КМ-альдолаза более чувствительна к термической денатурации, чем нативная альдолаза, но в присутствии возрастающих концентраций фосфата константа скорости реакции денатурации уменьшается, что указывает на насыщение 10-КМ-альдолазы фосфатом.

Это дает возможность предположить, что фруктозади-фосфат связывается с альдолазой посредством своих фос-фатных групп. Показано, что альдолаза имеет два участка

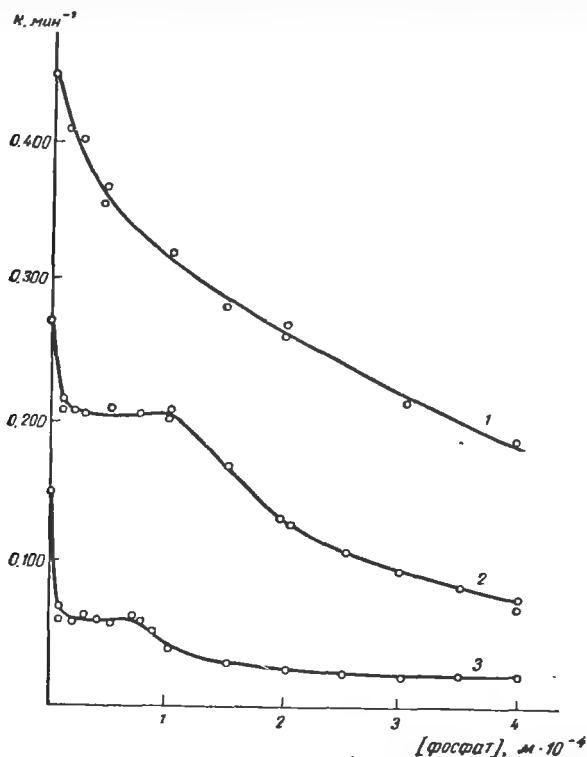


Рис. 85. Зависимость от концентрации фосфата скорости тепловой денатурации при 58° 10-КМ-альдолазы, альдолазы, содержащей 10 SH-групп, блокированных п-меркурибензоатом, и нативной альдолазы.

Трис-буфер pH 7,51, K, мин.⁻¹, константа скорости первого порядка реакции денатурации при 58°. Ход денатурации определяли путем измерения радиоактивности и (или) по изменению содержания белка, находящегося в надосадочной жидкости при термической обработке. 10-КМ альдолаза (1); альдолаза, содержащая 10 SH-групп, блокированных п-меркурибензоатом (2), нативная альдолаза (3).

связывания фосфата: более прочно и менее прочно связывающие участки [18]. Этот факт также подтверждается существованием промежуточного плато в опытах по защите нативной альдолазы и альдолазы, обработанной п-меркурибензоатом, от тепловой денатурации (рис. 85).

Тем не менее, когда мы сравнили защитное действие пирофосфата на 10-КМ-альдолазу, нативную альдолазу и альдолазу, содержащую 10 SH-групп, блокированных п-меркурибензоатом, мы не обнаружили промежуточное плато, характеризующее участок, прочно связывающий фосфат. Это означает, что карбоксиметилирование остатков цистеина-II лишь затрагивало участок альдолазы, прочно связывающий фосфат, но не разрушало его.

Итак, можно обсудить роль остатков цистеина-II в катализе. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что остатки цистеина-II располагаются в непосредственной близости к субстратсвязывающему участку, но не в самом участке. Они могут участвовать в связывании промежуточных продуктов и быть расположены в каталитическом участке. Доказательства этому еще нет, а непосредственное участие остатков цистеина-II изучается в настоящее время. Однако мы можем предположить локализацию цистеина-II в третичной структуре фермента. В соответствии с данными, приведенными на рис. 85, и некоторыми другими данными альдолаза претерпевает конформационные изменения в присутствии субстрата и фосфата. Разумно предположить поэтому, что защитное действие фосфата при алкилировании отражает положение остатков цистеина-II в пространственной структуре комплекса альдолаза — фосфат. Более того, кинетический анализ показывает, что алкилирование остатков цистеина-II следует за алкилированием остатков цистеина-I даже в отсутствие субстрата или фосфата. Эти данные согласуются с предположением о том, что остатки цистеина-II не располагаются на поверхности белка. По-видимому, они находятся весьма близко к поверхности, возможно в углублении, и полностью подвергаются действию карбоксиметилирующего агента после блокирования остатков цистеина-I.

ЛИТЕРАТУРА

1. Szabolcsi G., Biszku E., Szőrenyi B. Biochim. Biophys. Acta, 1959, 35, 237.
2. Szabolcsi G., Biszku E. Biochim. Biophys. Acta, 1961, 48, 355.
3. Szabolcsi G., Boross L., Biszku E. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 1964, 25, 149.
4. Kawahara K., Tanford C. Biochemistry, 1966, 5, 1578.
5. Zavadzky P., Biszku E. Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 1967, 2, 109.
6. Winstead J., Wold F. J. Biol. Chem., 1964, 239, 4212.

7. Morse D., Chan W., Horecker B. Proc. Natl. Acad. Sci. US, 1967, **58**, 628.
8. Rose J., Rieder S. J. Biol. Chem., 1958, **231**, 315.
9. Rose J. J. Am. Chem. Soc., 1958, **80**, 5835.
10. Lai C., Tchola O., Chang T., Horecker B. J. Biol. Chem., 1965, **240**, 1347.
11. Drechsler E., Boyer P., Kovalsky A. 1959, **234**, 2627.
12. Hoffee P., Lai C., Pough E., Horecker B. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1967, **57**, 107.
13. Pough E., Horecker B. Fed. Proc., 1967, **26**, 601.
14. Swenson A., Boyer P. J. Am. Chem. Soc., 1957, **79**, 2174.
15. Szabolcsi G., Sajgo M., Biszku E., Szajani B., Zavodszky P., Abaturon L. FEBS Meeting Symp., 1970, **18**.
16. Biszku E., Boross L., Szabolcsi G. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 1964, **25**, 161.
17. Biszku E., Szabolcsi G. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 1964, **25**, 169.
18. Ginsburg A., Mehler A. Biochemistry, 1966, **5**, 2623.
19. Kowal J., Cremona T., Horecker B. L. J. Biol. Chem., 1965, **240**, 2485.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение — <i>В. А. Яковлев</i>	3
Глава I. Коферменты и их роль в каталитическом действии ферментов. — <i>И. Я. Карпейский, А. Е. Браунштейн</i>	7
Глава II. Коферменты окислительно-восстановительных процессов	13
Взаимодействие никотинамидадениндинуклеотида с апоферментами дегидрогеназ. — <i>Н. И. Мальцев</i>	13
Исследование структуры НАД-зависимых дегидрогеназ. — <i>П. Элоди</i>	67
Коферментная и регуляторная функции никотинамидадениннуклеотидов. Кинетический аспект. — <i>Б. И. Курганов</i>	82
Химия убихинонов. — <i>Е. А. Обольникова</i>	117
Биохимическая роль убихинонов. — <i>Л. М. Райхман</i>	133
Химия флавиновых коферментов. — <i>Е. Д. Хомутова</i>	142
Механизм действия флавиновых ферментов. — <i>А. А. Глемжа</i>	157
Глава III. Коферменты переноса групп	177
Химия и механизм действия ферментов, связанных с нуклеозидифосфатсахарами. — <i>В. Н. Шибачев</i>	177
Пиридоксаль- и пиридоксаль-5'-фосфат-зависимые ферменты. — <i>Е. С. Северин</i>	197
Молекулярный механизм ферментативного трансаминирования. — <i>В. И. Иванов</i>	211
Синтез витаминов группы В ₆ , их коферментных форм и аналогов. — <i>В. Л. Флорентьев</i>	219
Кофермент ацилирования (кофермент А). Механизм действия и пути химического синтеза. — <i>В. М. Копелевич, <u>Е. С. Жданович</u></i>	238

Глава IV. Коферменты процессов синтеза и изомеризации	256
Новые аспекты химии тиаминдифосфата в реакциях окислительного и неокислительного декарбоксилирования α -кетокислот.— Л. С. Хайлова, А. М. Юркевич, С. Е. Северин	256
Химические модификации и свойства корринов.— Т. А. Мелентьева	291
Физико-химические основы действия кобамидного кофермента.— И. П. Рудакова, А. М. Юркевич	309
Современные представления о механизме действия B_{12} -зависимых ферментов.— А. А. Познанская	336
Глава V. Дополнение	361
Роль остатков цистеина в механизме действия альдолазы скелетной мышцы кролика.— Г. Саболчи, Б. Жаяни, Е. Бишку, М. Самго	361

Редактор *М. Н. Преображенская*

Художественный редактор *О. А. Четверикова*

Корректор *А. В. Морозова*

Техн. редактор *Н. С. Кузьмина*

Переплет художника *Л. А. Коровина*

Сдано в набор 12/VI 1972 г. Подписано к печати 29/XII 1972 г. Формат бумаги $84 \times 108^{1/32} = 11,75$ печ. л. (условных 19,74 л.) 21,57 уч.-изд. л. Бум. тип. № 2. Тираж 2500 экз. Т-18770. МН-79. Цена 2 р. 27 к.

Издательство «Медицина». Москва, Петров-веригский пер., 6/8.

Заказ № 429. Московская типография № 11 Союзполиграфпрома Государственного Комитета Совета Министров СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. Москва, 113105, Нагатинская, 1.